

**Enzymatische allylische Oxidation mit Lyophilisaten
des *Pleurotus sapidus***

**Enzymatic allylic oxidation with lyophilisates of
*Pleurotus sapidus***

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Aljona Rickert

**Vorgelegt dem Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Gießen 2016

Erstgutachter:

Prof. Dr. Holger Zorn

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Wolfgang Maison

Abgabe der Dissertation im Prüfungsamt:

Erklärung zur eigenständigen Anfertigung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Stellen der Arbeit, die anderen Quellen im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen wurden, sind durch Angaben der Herkunft kenntlich gemacht. Dies gilt auch für Zeichnungen, Skizzen und bildliche Darstellungen.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten.

(Aljona Rickert)

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinen beiden Doktorvätern Prof. Dr. Holger Zorn und Prof. Dr. Wolfgang Maison für die Möglichkeit meine Dissertation in ihren Arbeitsgruppen anfertigen zu können. Insbesondere gilt mein Dank für das hochinteressante Thema sowie stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der gesamten Promotion. Ihr kompetenter Rat und ihre Hilfe kamen mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zugute.

Prof. Dr. Richard Göttlich danke ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes während der letzten Versuche.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitskreise Maison und Zorn bedanken. Insbesondere möchte ich mich bei meinen Kollegen Eliza Franzmann, Ina Schüttmann, Dorith Clais, Tian Chen, Christian Küchenthal, Yanyan Zhang, Heike Thomanek, Alexander Heuger, Faiza Khalil und Marina Rusch für die schöne Zeit und Unterstützung im Labor bedanken.

Das letzte halbe Jahr durfte ich im Labor des Arbeitskreises Göttlich verbringen und auch bei seinen Mitgliedern, insbesondere bei Ute Mettal, Jasmin Herr und Dina Shaydulina möchte ich mich für die herzliche Aufnahme bedanken.

Besonders erwähnen und bedanken möchte ich mich bei „meinen“ Bachelor- und Masterstudenten Oliver Hammers, Nadja Kreuter, Holger Kremer und Verena Weidmann.

Unseren Azubis Sebastian Sommer und Markus Zimmer möchte ich für ihre helfenden Hände und Engagement danken.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern der Analytikabteilung für alle Messungen der NMR- und IR-Spektren. Frau Hausmann möchte ich für die Unterstützung bei der Auswertung so mancher kniffliger NMR-Spektren danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Erwin Röcker, welcher mir immer bei den GC-Messungen und besonders bei den Trennungen an der präp. GC mit Rat und Tat zur Seite stand. Ein herzlicher Dank geht auch an Edgar Reitz für die Hilfe bei technischen Problemen und für das Aufbewahren meines PC's während der Elternzeit. Rainer Schmidt danke ich für die schnelle Lieferung der Chemikalien.

Den guten Geistern der AG Zorn: Stella Nagy, Bianka Daubertshäuser, Siegrid Franke und Peter Seum möchte ich für ihre tatkräftige Unterstützung, stätige Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit danken.

Dafür, dass sie sich Zeit für das Korrekturlesen meiner Arbeit genommen haben und für die zahlreichen Verbesserungsvorschläge danke ich ganz herzlich Ute Mettal, Bernadette Nowak, Alla Rickert, Alex Rickert und Ewgeni Schleining.

Der größte Dank gilt meiner Familie. Meinem Mann, meinen Kindern, meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Großeltern. Danke, dass es euch gibt und dass ihr immer für mich da seid!

Inhaltsverzeichnis

Erklärung zur eigenständigen Anfertigung.....	II
Danksagung	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
Vorbemerkung.....	i
Abkürzungsverzeichnis	ii
Einleitung.....	1
Biotechnologie.....	1
Biokatalysatoren.....	2
Enzym-katalysierte Verfahren	2
Etablierte biotechnologische Verfahren	6
Biotechnologische Herstellung von Acrylamid 2	6
Biotechnologische Herstellung von 7-Aminocephalosporinsäure 6	7
Biotechnologische Herstellung von Sitagliptin 8	8
Kenntnisstand.....	9
Aroma	9
Terpene	10
Terpenoide	10
Basidiomyceten als Aromaproduzenten	12
Allylische Oxidation	14
Aufgabenstellung und Zielsetzung	16
Resultate und Diskussion	18
Kulturführung und Herstellung von Lyophilisaten	18
Methodenentwicklung	19
Scale-up und Optimierung der Lyophilisatmenge	19
Standardmethode	21
Kontrollexperimente	23
Toleranz von organischen Reaktionsmedien	23
Biotransformation von Terpenen.....	26
Biotransformation von (+)-Valencen 12	27
Biotransformation von 3-Caren 24.....	28
Biotransformation von α -Pinen 25.....	29

Regioselektivität	30
Biotransformation von β -Ionon 26.....	32
Biotransformation von (+/-)-Limonen 33	33
Biotransformation von (-)-Isolongifolen 31.....	35
Biotransformation von β -Cyclocitral 32	36
Biotransformation von γ -Terpinen 34	37
Biotransformation von Cycloalkenen	39
Biotransformation von Cyclohexenderivaten	41
Biotransformation von 1- <i>tert</i> -Butylcyclohexen 51.....	41
Biotransformation von 1-Phenylcyclohexen 54	42
Biotransformation der Methylcyclohexene 56, 57 und 58	44
Biotransformation von Aromaten	45
Biotransformation von 1,2-Dihydronaphthalin 59	45
Biotransformation von Tetrahydronaphthalin 60	46
Biotransformation von Diphenylmethan 61.....	47
Biotransformation von Heterocyclen	49
O-Heterocyclen.....	49
Biotransformation von 3,4-Dihydro-2 <i>H</i> -pyran 72 und 2-Methoxy-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -pyran 73	50
Synthese von 1-Propyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -pyran 75.....	51
Biotransformation von 1-Propyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -pyran 75.....	52
N-Heterocyclen.....	54
Biotransformation von <i>N</i> -Boc-4,5-Dihydropyridin 79	54
Biotransformation von <i>N</i> -Boc-5,6-Dihydropyridin 80	56
Synthese von 1,2,3,4-Tetrahydropyridin 84 und 1,2,3,6-Tetrahydropyridin 85	57
Biotransformation von acyclischen Verbindungen	58
Biotransformation von Citronellal 86	58
Biotransformation von <i>trans</i> -Dec-5-en 88	59
Synthese von <i>cis</i> -Dec-5-en 92	60
Biotransformation von <i>cis</i> -Dec-5-en 92	61
Biotransformation von 2,3-Dimethylpent-2-en 93	61
Biotransformation von Linolsäuremethylester 96 und Myrcen 95	63
Biotransformation von Polyöl 110.....	64
Anwendungsmöglichkeiten in der organischen Synthese	68
Synthese und Biotransformation von Neroloxid 101	68
Synthese von Weinlacton 104.....	71

Synthese von 3-Oxo- β -Ionon 110 und Dihydroactinidiolid 111	73
Zusammenfassung.....	75
Abstract	76
Experimenteller Teil	77
Reinigung.....	77
Säulenchromatographie	77
Dünnschichtchromatographie.....	77
Präparative Gaschromatographie	77
Analytik.....	78
NMR-Spektroskopie.....	78
Massenspektrometrie	79
Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID).....	79
Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor (GC-MS)	79
Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor und Olfaktometrieport (GC-O)	79
Berechnung der Kovats-Indizes	80
IR-Spektroskopie.....	80
Röntgenstrukturanalyse	80
Mikrobiologie: Geräte und sonstige Hilfsmittel	81
Kulturführung von Transformationskulturen.....	81
Verwendeter Mikroorganismus	81
Standard-Nähr-Lösung (SNL-Medium)	82
SNL-H-Agar	82
Stammkultivierung	83
Vorkultur.....	83
Hauptkultur	83
Herstellung von Lyophilisaten	83
Allgemeine Arbeitsvorschrift.....	84
AV 1: Biotransformation mit Lyophilisaten von <i>Pleurotus sapidus</i>	84
Biotransformation von Terpenen.....	85
Biotransformation von Cyclohexen und Cyclohexenderivaten.....	95
Biotransformation von Aromaten	100
Biotransformation von heterozyklischen Verbindungen	104
Biotransformation von acyclischen Olefinen	108
Biotransformationen im Rahmen der organischen Synthese	111
Biotransformation von Dimethylcyclohexenylpropansäure 109	113

Synthese von 3-Oxo- β -Ionon 110; Dihydroactinidiolid 111	114
Nicht-umgesetzte Verbindungen	116
Darstellung von nicht käuflich erhältlichen Substraten	118
Dimethylcyclohexenylpropansäure 109 ²⁴⁷	125
Anhang	126
Literaturverzeichnis	142

Vorbemerkung

Diese Doktorarbeit beinhaltet die Ergebnisse mehrerer Bachelorarbeiten, die unter meiner Aufsicht geschrieben wurden.

Aus diesem Grund sind Teile der Ergebnisse bereits in folgenden Bachelorarbeiten zu finden:

- Oliver Hamers

„Evaluierung des Substratspektrums der enzymatischen allylischen Oxidation mit *Pleurotus sapidus*“, Gießen **2010**.

- Nadja Kreuter

„Enzymatische allylische Oxidation von heterozyklischen Aromastoffen“, Gießen **2011**.

- Holger Kremer

„Synthese und enzymatische Umsetzung von Weinlacton und dessen Derivaten“, Gießen **2011**.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in einer wissenschaftlichen Zeitschrift veröffentlicht.

- Rickert, A.; Krombach, V.; Hamers, O.; Zorn, H.; Maison, W. *Green Chem.* **2012**, *14*, 639.

Abkürzungsverzeichnis

δ	chemische Verschiebung [ppm]
λ	Wellenlänge [nm]
ν	Wellenzahl [cm ⁻¹]
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
abs	absolutiert
ATR	abgeschwächte Totalreflexion
9-BBN	9-Borabicyclo[3.3.1]nonan
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
COSY	Correlated spectroscopy
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Dublett von Dublett
DDH	1,3-Dibrom-5,5-dimethylimidazolidin-2,4-dion
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DHP	Dihydropyran
ee	Enantiomerenüberschuss
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
ges	gesättigt
h	Stunden
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HPLC	High pressure liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence

Hz	Hertz
IR	Infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante [Hz]
KI	Kovats-Index
konz	konzentriert
KOtBu	Kalium- <i>tert</i> -butanolat
L	Liter
LCMS	Liquid chromatography mass spectrometry
m	Multiplett
M	molare Masse
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
Me	Methyl
min	Minuten
Mio	Million
mL	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
nm	Nanometer
NMR	Nuclear magnetic resonance / Kernmagnetresonanzspektroskopie
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
PCC	Pyridiniumchlorochromat
PDC	Pyridiniumdichromat
Ph	Phenyl
ppm	parts per million
PSA	<i>Pleurotus sapidus</i>
PSO	<i>Pleurotus ostreatus</i>
q	Quartett
quant.	quantitativ

quin	Quintett
R_f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
sec	secundär
t	Triplett
TIC	total ion current
tert	tertiär
TOF	time-of-flight
w	schwach

Einleitung

Ob im Joghurt, im Waschmittel oder in der Hautcreme - in einer Vielzahl von industriellen Produkten steckt Biotechnologie. Seit jeher standen bei industriellen Prozessen solche Aspekte wie Kostenreduzierung, Erhöhung der Qualität und Verbesserung der Sicherheit im Vordergrund. Doch in den letzten Jahrzehnten zeigt sich zusätzlich ein immer stärker werdender Trend zu umweltfreundlichen, energiesparenden, ressourceneffizienten, gesundheitsorientierten und nachhaltigen Prozessen. Aus diesen Gründen rückt die Biotechnologie sowohl im industriellen^{1,2} als auch im akademischen³ Umfeld immer mehr in den Vordergrund und gewinnt vor allem bei der Entwicklung und Herstellung von pharmazeutischen,⁴⁻⁷ kosmetischen,⁸ lebensmittelchemischen⁹⁻¹¹ aber auch vielen anderen Produkten^{12,13} an Bedeutung.

Biotechnologie

Als Biotechnologie wird die Anwendung von Kenntnissen und Prozessen der Biologie und Biochemie in technischen Verfahren bezeichnet, wobei die Eigenschaften von Organismen technisch oder wirtschaftlich ausgenutzt werden.¹⁴ Seit tausenden von Jahren wendet die Menschheit biotechnologische Verfahren zur Erzeugung von Milchprodukten, wie zum Beispiel Käse oder Joghurt an.^{15,16} Aber auch das Brauen von Bier oder die Herstellung von Wein sind sehr bekannte Beispiele für die Anwendung der Biotechnologie.¹⁷

Die industrielle Biotechnologie, auch „Weiße Biotechnologie“ genannt, ist der Bereich der Biotechnologie, welcher biotechnologische Methoden für die industrielle Produktion von organischen Grund- und Feinchemikalien sowie Wirkstoffen einsetzt. Die Bezeichnung „Weiße Biotechnologie“ grenzt die industrielle Biotechnologie von der „Grünen“ und der „Roten“ Biotechnologie ab, die sich mit Pflanzen bzw. Medizinprodukten befassen.¹⁸ In **Abbildung 1** ist die Wachstumskurve für die „Weiße Biotechnologie“ dargestellt, welche auf 10% jährlich beziffert wird. Diese liegt damit deutlich über der Umsatzzunahme für die gesamte chemische Industrie, die man etwa auf 3% schätzt.¹⁹

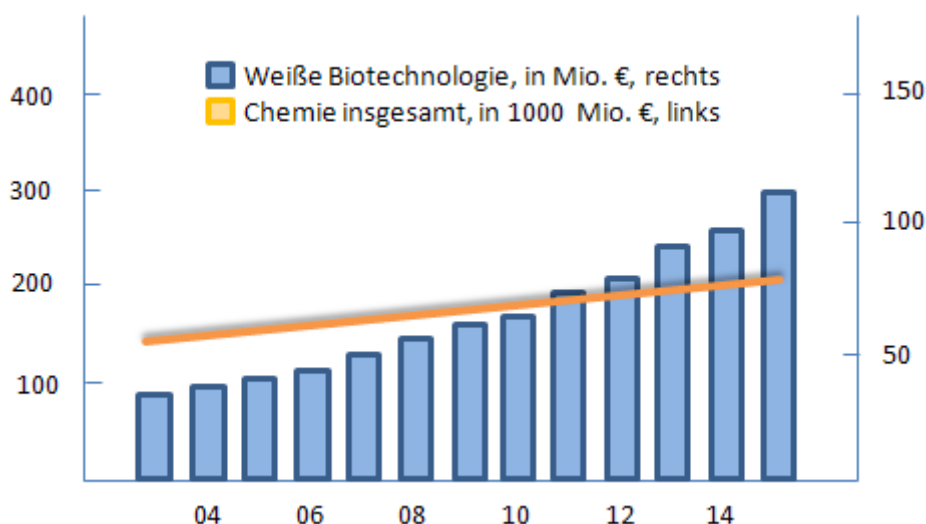


Abbildung 1: Weltweiter Umsatz mit Produkten der Weißen Biotechnologie von 2003 bis 2015.¹⁹

Biokatalysatoren

Die Herstellung von wertvollen Produkten durch chemische Umsetzungen trägt seit Jahrhunderten signifikant und auf hohem Niveau zur Verbesserung der Lebensqualität bei. Aus wirtschaftlichen und ökologischen Gründen ist es empfehlenswert, einige der stöchiometrischen Prozesse durch katalytische Varianten zu ergänzen.²⁰ Neben den klassischen Metall- und Organokatalysatoren zeigen Biokatalysatoren ein großes Potenzial als umweltfreundliche Alternative in vielen industriellen Prozessen.²¹⁻²³

Bei Biokatalysatoren handelt es sich meistens um Enzyme,^{23,24} aber auch andere Makromoleküle wie Antikörper,²⁵⁻²⁷ Ribozyme^{28,29} und Desoxyribozyme³⁰⁻³² kommen zum Einsatz.³³

Enzym-katalysierte Verfahren

Der Bedarf an neuen Enzymen als Biokatalysatoren für die biotechnologische Industrie nimmt stetig und schnell zu. Eine besonders reichhaltige Quelle für neue Enzyme sind Mikroorganismen, wie zum Beispiel Bakterien, Pilze, Hefen oder Algen. Mikroorganismen bevölkern nahezu jedes Biotop der Erde. Ihre Besonderheit liegt darin, dass Mikroorganismen in der Lage sind, unter extremen Lebensbedingungen zu bestehen.³⁴ Auf der Erde existieren zahlreiche lebensfeindliche Bereiche wie zum Beispiel heiße Quellen oder sehr salzhaltige und unter Umständen extrem kalte Gewässer, aber selbst an diesen Orten ist ein Leben für Mikroorganismen möglich.³⁵ Beispielsweise wurde eine Methan-Monooxygenase aus dem Bakterium *Methylococcus capsulatus* sp. aus heißen Quellen

isoliert.³⁶ Diese Bakterien nutzen das Treibhausgas Methan als einzige Energiequelle und sind daher ökologisch sehr wertvoll.

Die Fähigkeit der Mikroorganismen, unter extremen Lebensbedingungen zu überleben und zu arbeiten, ist für die Forschung von besonderer Bedeutung, denn diese Fähigkeit ist überwiegend auf Enzyme zurückzuführen. Um diese Enzyme biokatalytisch nutzen zu können, gibt es zwei klassische Herangehensweisen, welche in der **Abbildung 2** dargestellt sind.

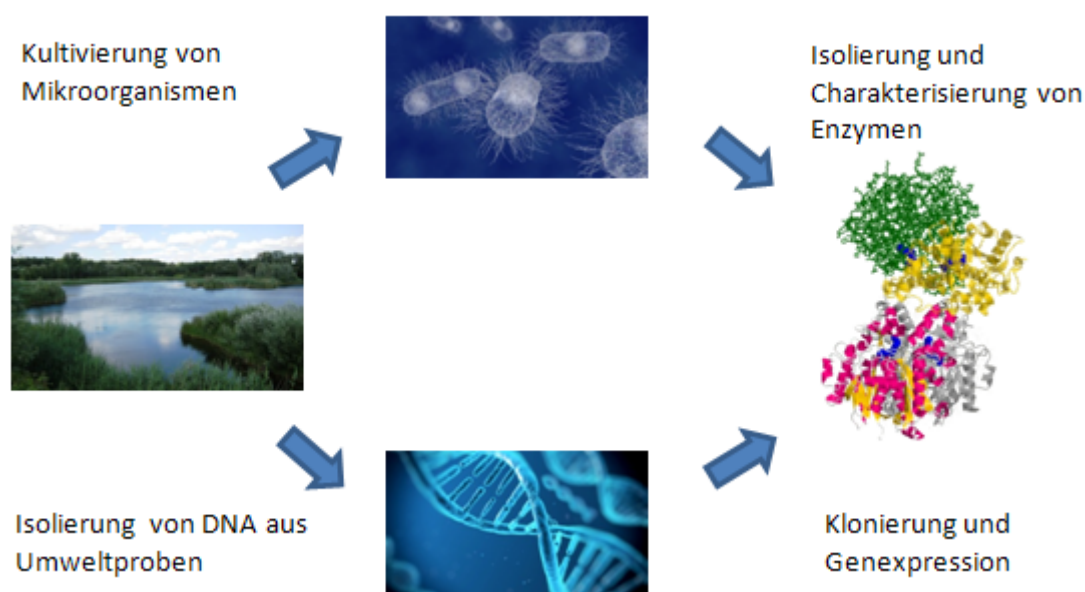


Abbildung 2: Klassische Herangehensweisen zur Gewinnung neuer Enzyme.³⁷

Bei der ersten Variante werden die Mikroorganismen mit interessanten Aktivitäten vermehrt, woraufhin die Enzyme isoliert und charakterisiert werden.³⁸ Ein Nachteil besteht allerdings darin, dass Schätzungen zu Folge mehr als 99% aller Mikroorganismen mit den heutigen Kulturführungstechnologien nicht kultiviert werden können.³⁹

Alternativ ist es mit modernen gentechnischen Methoden möglich das Metagenom¹ von Mikroorganismen einer Umweltprobe zu isolieren.⁴¹⁻⁴³ Anschließend wird die DNA nach neuen biokatalytisch aktiven Genen durchmustert.⁴⁴ Es ist hierbei nicht mehr nötig, die Mikroorganismen anziehen zu können.

¹ Das Metagenom: Der mikrobiologisch geprägte Begriff „Metagenom“ bezeichnet die Gesamtheit der genetischen Information aller Mikroorganismen eines Habitats (z.B. Boden, Meerwasser, Wiederkäuermagen) zu einem gegebenen Zeitpunkt.³⁹ (40) Handelsman, J.; Rondon, M. R.; Brady, S. F.; Clardy, J.; Goodman, R. M. *Chem. Biol.* **1998**, 5, R245.

Besonders ihre hohe Selektivität und die Fähigkeit, unter milden Bedingungen zu arbeiten, fördern den Einsatz von Enzymen für die Produktion kleiner Moleküle, insbesondere in der Lebensmittel-, Pharma- und Kosmetikindustrie. Enzyme werden entsprechend ihrer Mechanismen in sechs verschiedene Enzym-Klassen unterteilt. Die erste Klasse wird von den Oxidoreduktasen gebildet, die für Redoxreaktionen verantwortlich sind. Transferasen übertragen funktionelle Gruppen, wie Methyl-, Amino- oder Phosphatgruppen. Hydrolasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von Glycosid-, Ester- oder Peptidbindungen. Lyasen katalysieren nicht-hydrolytische Spaltungen von Molekülen, häufig unter Ausbildung von Doppelbindungen wie C=C, C=O und C=N.⁴⁵ Isomerasen sorgen hingegen für eine intramolekulare Neuordnung und Ligasen katalysieren die Verknüpfung zweier Moleküle durch eine kovalente Bindung.^{46,47} **Abbildung 3** zeigt, dass bei der industriellen Verwendung als Biokatalysator am häufigsten Hydrolasen genutzt werden.^{48,49} Prozesse, welche von Lyasen und Transferasen katalysiert werden, sind jedoch auch sehr erfolgreich.⁴⁸ Signifikant ist auch die Zahl der enzymatisch katalysierten Redox-Prozesse, allerdings werden hierbei häufiger nicht die isolierten Enzyme, sondern Ganzzellsysteme verwendet.

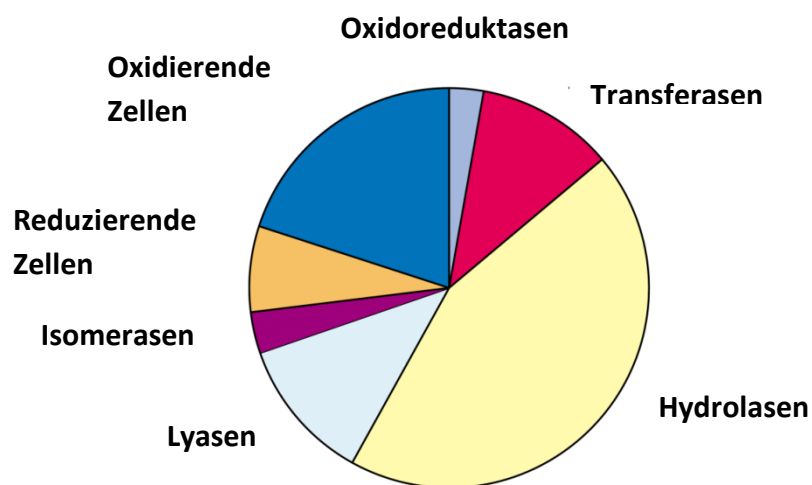


Abbildung 3: Verwendung verschiedener Enzym-Klassen für industrielle Biotransformationen.^{48,49}

Der Vorteil von Enzymen liegt darin, dass sie in der Lage sind, Reaktionen unter milden Bedingungen zu katalysieren.⁵⁰ Dabei liegt der optimale Temperaturbereich in der Regel zwischen 20 und 40 °C. Die niedrigen Temperaturen sorgen auch dafür, dass unerwünschte Nebenreaktionen weitgehend unterdrückt werden.⁴⁶ Auch die hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität einiger Enzyme macht sie für den Einsatz in organischen Synthesen interessant.^{13,46} Enzym-katalysierte Verfahren lassen sich je nach Darreichungsform der Enzyme in drei Gruppen unterteilen (**Abbildung 4**).



Abbildung 4: Beispiele für Anwendungsmöglichkeiten von Enzymen bei Enzym-katalysierten Verfahren.

Für einige Prozesse können lebende Zellen intakter Mikroorganismen als Biokatalysatoren verwendet werden.⁵¹ Dabei wird mit Hilfe der *de novo*-Biosynthese der Stoffwechsel lebender Mikroorganismen zur Naturstoff- oder Wirkstoffproduktion ausgenutzt.⁵²⁻⁵⁴ Die Biosynthesewege vieler Mikroorganismen können zu diesen Zwecken durch die Nutzung der Gentechnik verändert werden.^{55,56} Ein bekanntes Beispiel ist die biotechnologische Herstellung des lebenswichtigen Hormons Insulin mit *E. coli*-Bakterien.⁵⁷

Am häufigsten aber werden Enzyme in isoliertem Zustand genutzt. Sie können dabei sowohl frei in Lösung⁵⁸ als auch in immobilisierter Form⁵⁹⁻⁶² vorliegen. Isolierte Enzyme zeigen eine hohe Produktivität und eine große Toleranz gegenüber hohen Substratkonzentrationen. Bei der Nutzung von isolierten Enzymen ist eine definierte Dosierung möglich. Die isolierten Enzyme weisen zudem hohe Aktivitäten unter wässrigen Bedingungen auf, können aber auch organischen Lösungsmitteln ausgesetzt werden und im Falle einer Immobilisierung können sie leicht aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden.⁴⁶ Neben den positiven Eigenschaften gibt es bei der Verwendung von isolierten Enzymen auch einige Nachteile. Die Isolierung und Reinigung von Enzymen kann sehr teuer und zeitaufwendig sein. Viele Enzyme sind auf Co-Faktoren angewiesen, welche oft kostenintensiv sein können, was einen industriellen Prozess möglicherweise unwirtschaftlich macht. Dieses Problem tritt besonders bei Reaktionen auf, welche nicht nur von einem Enzym, sondern von einer ganzen Reihe von Enzymen katalysiert werden.⁵⁰ Außerdem kann die zuvor angesprochene hohe Selektivität auch zum Nachteil werden, da viele enzymatisch katalysierte Reaktionen durch ihre Substratspezifität limitiert werden.

Neben dem Einsatz von isolierten Enzymen gibt es darüber hinaus die Möglichkeit, ein Ganzzellsystem aus aufgeschlossenen Zellen, welches als Lyophilisat bezeichnet wird, zu verwenden.⁶³ Der Einsatz von Lyophilisaten ist in aller Regel wirtschaftlicher als der von isolierten Enzymen, denn die Isolierung und Reinigung der Enzyme sowie das Zuführen und das Recycling der verwendeten Co-Faktoren ist bei Ganzzellsystemen nicht notwendig.⁴⁶ Allerdings gibt es auch bei der Verwendung von Lyophilisaten einige Nachteile. Zum Beispiel sind Konkurrenzreaktionen mit anderen, in dem System enthaltenen Enzymen zu erwarten. Es müssen aber auch einige technische Schwierigkeiten bei der Verwendung von großen Mengen an Biomasse überwunden werden, wenn man eine hohe Produktkonzentration erreichen möchte.⁴⁶

Etablierte biotechnologische Verfahren

Für biotechnologisch hergestellte Chemikalien, Treibstoffe (Biodiesel und Bioethanol) und Pharmaka werden in den nächsten Jahren hohe Zuwachsraten prophezeit. Im Folgenden werden einige etablierte Verfahren beschrieben, um einen Eindruck der Leistungsfähigkeit biotechnologischer Methoden zu vermitteln.

Biotechnologische Herstellung von Acrylamid 2

Acrylamid **2**, ein wichtiges Monomer für die Herstellung von Kunststoffen, ist die erste biotechnologisch hergestellte Chemikalie, welche im industriellen Maßstab produziert wurde (**Abbildung 5**).²³ Der klassische chemische Herstellungsprozess von Acrylamid **2** verläuft unter Kupferkatalyse, wobei jedoch kein vollständiger Umsatz erreicht wird. Dies macht neben der Entfernung von nicht umgesetztem Acrylnitril **1** einen Ionentausch der Acrylamid-Rohlösung notwendig.⁶⁴

Die Entdeckung der Nitril-Hydratase und deren Anwendung bietet eine umweltfreundliche Alternative zur synthetischen Herstellung von Acrylamid **2**.⁶⁴ Der dazu verwendete Mikroorganismus *Rhodococcus rhodochrous* J1⁶⁵ zeigt eine außergewöhnlich hohe Reaktivität gegenüber dem Edukt Acrylnitril **1** sowie eine sehr hohe Stabilität gegenüber dem Produkt Acrylamid **2**. Durch die milden Reaktionsbedingungen und die geringe Reaktionstemperatur von 15 °C ist keine Nachbehandlung des Roh-Acrylamids notwendig. Die Selektivität des Biokatalysators liegt bei 99,98% und der Umsatz bei 99,97%. Aufgrund dieser Effektivität werden mittlerweile mehr als 30.000 Jahrestonnen Acrylamid **2** auf diesem Wege hergestellt, was einem Anteil von ca. 25% entspricht.⁶⁶

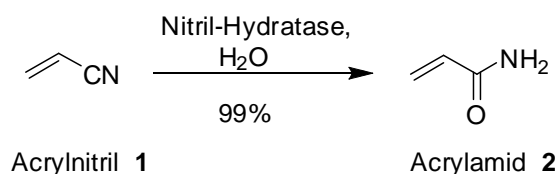


Abbildung 5: Umsetzung von Acrylnitril 1 zu Acrylamid 2 mit einer Nitril-Hydratase.^{23,66}

Biotechnologische Herstellung von 7-Aminocephalosporinsäure 6

Die mengenmäßig bedeutsamsten biotechnologischen Verfahren sind bei der Produktion von Antibiotika-Vorstufen zu finden.^{5,23,67} Aus fermentativ hergestelltem Cephalosporin C **3** kann so mittels einer Enzymkaskade 7-Aminocephalosporinsäure **6**, ein zentrales Zwischenprodukt für semisynthetische Antibiotika der Penicillin- und Cephalosporinreihe, hergestellt werden (**Abbildung 6**).^{37,68} Auch hier wurden aufwendige chemische Prozesse, welche den Einsatz chlorierter Lösungsmittel und aggressiver Reagenzien wie Phosphorpentachlorid erfordern, durch die milde enzymatische Katalyse abgelöst. Die verwendeten Enzyme sind in diesen hochoptimierten Prozessen zur Standzeiterhöhung an einem Träger immobilisiert.³⁷

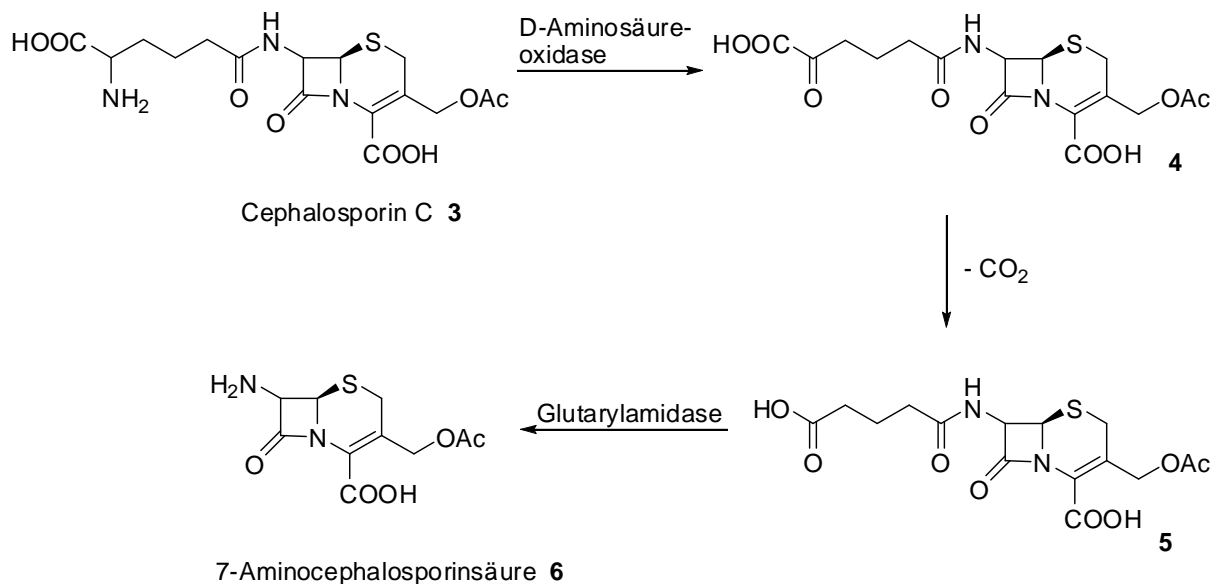


Abbildung 6: Enzymatische Darstellung von 7-Aminocephalosporinsäure **6** unter Verwendung der D-Aminosäureoxidase und der Glutarylamidase. 7-Aminocephalosporinsäure **6** ist ein wichtiges Zwischenprodukt für halbsynthetische Antibiotika.

Biotechnologische Herstellung von Sitagliptin 8

Sitagliptin **8** ist ein oral wirksames Arzneimittel zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2.^{69,70} Die enzymatische Route zur Synthese von Sitagliptin **8** aus Prositagliptin **7** bringt im Vergleich zur chemischen Route⁷¹ höhere Ausbeuten unter gleichzeitiger Erzeugung eines hohen Enantiomerenüberschusses von 99,5% e.e. (**Abbildung 7**).¹ Als transformierendes Enzym wird dabei eine durch direkte Evolution weiter entwickelte Amino-Transaminase verwendet.⁷²

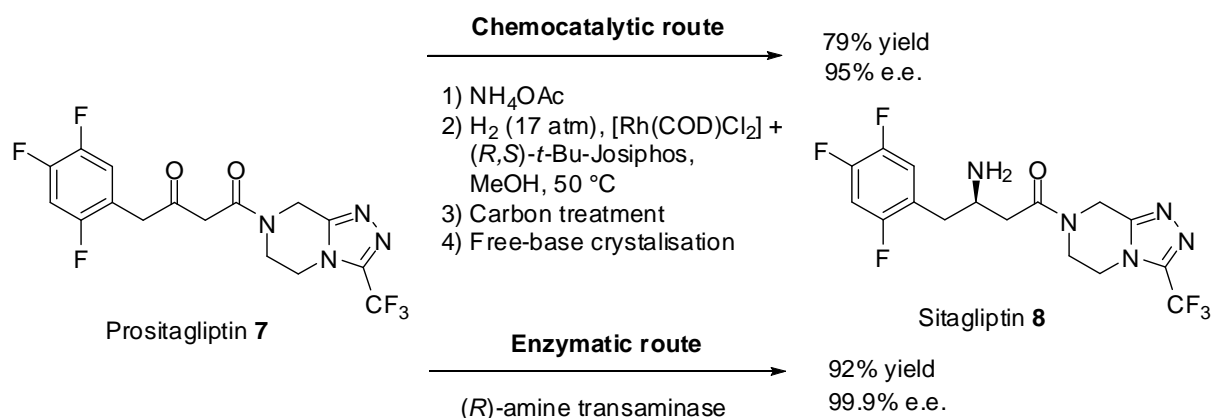


Abbildung 7: Synthese von Sitagliptin **8** aus Prositagliptin **7**. Der Vergleich zwischen der chemischen Synthese und der enzymatischen Katalyse zeigt, dass bei der Verwendung der Amino-Transaminase höhere Ausbeuten unter Erzeugung eines hohen e.e. erzielt werden können.^{71,72}

Kenntnisstand

Aroma

In der heutigen Gesellschaft spielen Aromen und Riechstoffe eine große Rolle. Geruchsaktive Stoffe finden in einer Vielzahl von Produkten des täglichen Lebens wie Lebensmitteln, Kosmetika, Haushaltsprodukten und Pharmaka Verwendung. Heutzutage werden bis zu 15% aller auf dem Markt befindlichen Lebensmittel durch Zusätze aromatisiert. Die Gewinnung von Aromastoffen aus verschiedenen Pflanzenteilen (Früchten, Blüten, Samen, Wurzeln u.v.m.) mittels Extraktion oder Destillation wird auch heute noch durchgeführt und die Extrakte, beziehungsweise die daraus isolierten Verbindungen, kommen als hochwertige Produkte in den Handel.

Allein durch natürliche Extrakte kann der große Bedarf an Aromastoffen allerdings nicht gedeckt werden. Deshalb erfolgt deren Herstellung zu 80% auf synthetischem Wege. Die chemische Synthese von Aromastoffen im Lebensmittelbereich ist jedoch stark umstritten. Die Synthesestufen sind oft aufwendig, wenig spezifisch und die Produkte dürfen lebensmittelrechtlich nicht als „natürlich“ deklariert werden. Durch die Aromenverordnung (EG 1334/2008) werden natürliche Aromen als „durch enzymatische oder mikrobielle Verfahren aus Ausgangsstoffen pflanzlicher oder tierischer Herkunft...“, definiert und dürfen somit mit Hilfe biotechnologischer Verfahren hergestellt werden. Die biokatalytische Umwandlung gewährt den Erzeugern Syntheseprodukte, welche weiterhin das Prädikat „natürlich“ tragen und dadurch eine höhere Akzeptanz beim Konsumenten gewinnen.^{10,52,73} Hierbei finden zwei unterschiedliche Verfahren Verwendung (**Abbildung 8**).

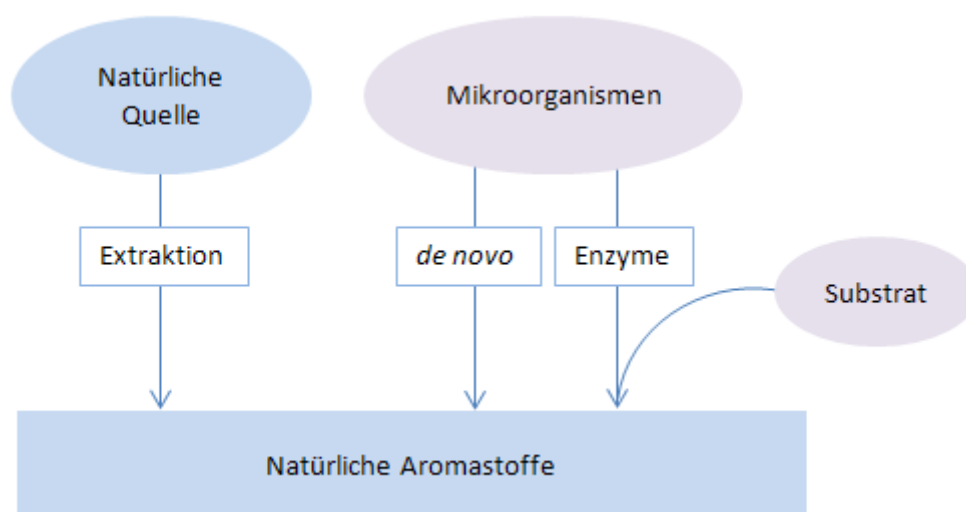


Abbildung 8: Möglichkeiten zur Erzeugung natürlicher Aromastoffe.

Bei der *de novo*-Biosynthese wird der Stoffwechsel lebender Mikroorganismen oder Pflanzen ausgenutzt.⁵²⁻⁵⁴ Mikroorganismen sind in der Lage, während der Fermentation Aromen als Sekundärmetabolite zu erzeugen, wobei häufig eine Mischung aus verschiedenen Aromaverbindungen erhalten wird. Für die Herstellung von Aromastoffen mit Hilfe von Biokatalysatoren werden hingegen kostengünstige, in großen Mengen verfügbare Substrate benötigt.

Terpene

Eine wichtige Gruppe der Aromastoffe bilden die Terpene.⁷⁴ Mit bisher über 25.000 bekannten Verbindungen stellen sie die größte Gruppe natürlicher Substanzen dar.⁷⁵ Viele Terpene wie z.B. Limonen **33** und α -Pinen **25** sind kostengünstig und in großen Mengen erhältlich. Das Grundgerüst der Terpene ist von Isopreneinheiten abgeleitet. Durch deren Wiederholung, Cyclisierung und Umlagerung entsteht die enorme Diversität dieser Verbindungsklasse. Zur Gruppe der Terpene zählen unter anderem die aus zwei Isopreneinheiten aufgebauten Monoterpene (C₁₀) und die aus drei Isopreneinheiten aufgebauten Sesquiterpene (C₁₅), zu deren Biosynthese fast alle höheren Lebewesen fähig sind. Isopren tritt dagegen als Vorstufe der Terpenbiosynthese nicht direkt in Erscheinung. Die Biosynthese verläuft über den sogenannten Mevalonsäure-Weg mit Isopentenylidiphosphat, beziehungsweise dessen Isomer 3,3-Dimethylallyldiphosphat als Grundbaustein.⁷⁶ Neben dem länger bekannten Mevalonsäure-Weg gewinnt der Deoxyxylulosephosphat-Biosyntheseweg (DOXP-Weg) als alternativer Terpenbiosyntheseweg an Bedeutung.⁷⁷ Dieser Stoffwechselweg kommt sowohl in gramnegativen und einigen grampositiven Bakterien als auch in Pflanzen, nicht jedoch in Säugetieren vor.

Terpenoide

Durch Oxifunktionalisierung von Terpenen werden Terpenoide erhalten. Schätzungen zur Folge existieren in der Natur mehr als 40.000 verschiedenen Terpenoide, wobei die meisten von ihnen pflanzlichen Ursprungs sind und in komplex zusammengesetzten Ölen vorkommen.⁷⁸ Viele von ihnen spielen eine bedeutende Rolle für das Wachstum und den Stoffwechsel von Pflanzen. Mono- und Sesquiterpenoide bilden vielfach die Schlüsselaromastoffe pflanzlicher etherischer Öle und sind wichtige Aromastoffe für Lebensmittel, Parfüms und Kosmetika. Dabei zeigen vor allem die einfach oxidierten Verbindungen eine große Vielfalt an Geruchseindrücken, wohingegen die reinen Terpenkohlenwasserstoffe eher unauffällige, weniger bedeutende Geruchsqualitäten aufweisen.⁷⁹

Das Einsatzgebiet von Terpenoiden beschränkt sich bei weitem nicht nur auf die Verwendung als Aroma- und Duftstoffe. Die Anwendung als Wirkstoff zur Therapie diverser Krankheiten, zum Beispiel

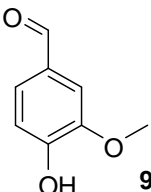
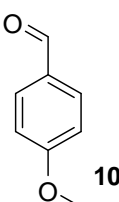
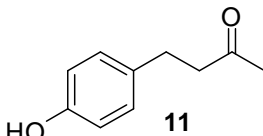
Krebs,⁸⁰ wurde bereits diskutiert und es konnten antimikrobielle Eigenschaften⁸¹ beschrieben werden.

Der erhöhte Bedarf an Terpenoiden führte dazu, dass diese vermehrt durch Chemosynthesen erzeugt wurden, da die Extraktion aus natürlichen Quellen häufig kostenintensiv und unwirtschaftlich ist. Heutzutage werden zahlreiche Anstrengungen unternommen, um den erhöhten Bedarf durch biotechnologische Verfahren decken zu können. Als Substrate dienen hierbei häufig Terpene, welche durch Neben- und Abfallströme insbesondere der Holz- und Lebensmittelindustrie entstehen und in nahezu unlimitierten Mengen zur Verfügung stehen.⁷⁹

Basidiomyceten als Aromaproduzenten

Pilze, mit ihrem einzigartigen Enzymsystem, finden seit tausenden von Jahren als Speise- und Würzpilze sowie in der Volksmedizin Verwendung. Die Gruppe der Basidiomyceten (Ständerpilze), zu denen fast alle Speisepilze zählen, umfasst mehr als 30.000 verschiedene Arten.⁸² Sie besitzen einen besonders robusten oxidativen Stoffwechsel und sind daher eine reiche Quelle für oxidativ wirkende Enzyme. Viele Basidiomyceten sind in der Lage, natürliche Aromastoffe sowohl *de novo* als auch durch Biotransformation zu bilden.^{54,83-86} **Tabelle 1** zeigt drei Beispiele für Aromastoffe, bei deren Herstellung Basidiomyceten als Biokatalysatoren verwendet wurden.

Tabelle 1: Verschiedene durch Basidiomyceten hergestellte Aromastoffe.⁸⁵

Verbindung	Gattung	Edukt
Vanillin	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ^{87,88}	Vanillinsäure
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> ⁸⁹	Ferulasäure
Anisaldehyd	<i>Ischnoderma bonzoinum</i> ⁹⁰	Tyrosin
	<i>Pleurotus eryngii</i> ⁹¹	Lignin
	<i>Pleurotus ostreatus</i> ⁹¹	Lignin
Himbeerketon	<i>Nidula niveo-tomentosa</i> ⁹²	L-Phenylalanin
		

Die Basidiomyceten *Phanerochaete chrysosporium*^{87,88} und *Pycnoporus cinnabarinus*⁸⁹ können zur Herstellung des bedeutenden Aromastoffs Vanillin genutzt werden, wobei Vanillinsäure und Ferulasäure jeweils als Substrate dienen. *Ischnoderma bonzoinum*⁹⁰ ist in der Lage, Tyrosin in Anisaldehyd zu transformieren und auch viele *Pleurotus*-Arten⁹¹ können zu dessen Herstellung genutzt werden. *Nidula niveo-tomantosa*, ein Vogelnestpilz, ist in der Lage, das L-Phenylalanin zu Himbeerketon zu konvertieren.⁹²

Die Biotransformation des Sesquiterpens Valencen **12** zum Nootkaton **15** ist ökonomisch sehr interessant und eine biotechnologische Herausforderung. Valencen **12**, welches einen hohen Anteil am Orangenaroma ausmacht, ist ein kostengünstiges und leicht erhältliches Substrat. Nootkaton **15** auf der anderen Seite ist wegen seines intensiven Grapefruitaromas eine höchst gefragte Aromaverbindung.⁹³⁻⁹⁵ Zahlreiche biokatalytische Methoden zur Herstellung von Nootkaton **15** sind in der Literatur zu finden.⁹⁶⁻⁹⁸ Kaspera und Fraatz nutzten den Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* (PSA) zur Produktion von Nootkaton **15** und erreichten, insbesondere mit dessen Lyophilisaten, hervorragende Ergebnisse (**Abbildung 9**).⁹⁸⁻¹⁰⁰ Das für die Umsetzung verantwortliche Enzym konnte als Dioxygenase^{99,100} identifiziert werden.

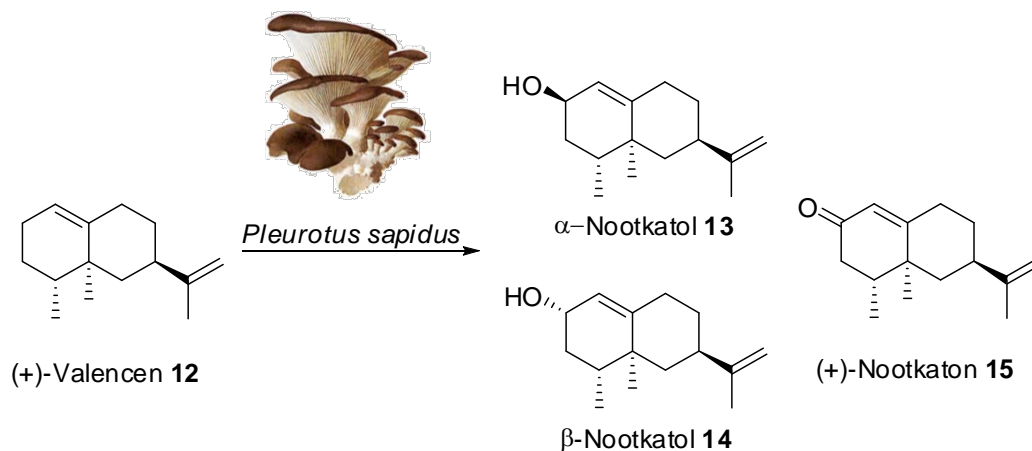


Abbildung 9: Biotransformation von Valencen **12** zum Grapefruitaroma Nootkaton **15** mit Lyophilisaten des Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* (PSA).

Allylische Oxidation

Die selektive Oxidation von C-H-Bindungen ist ein wichtiges Werkzeug für die chemische Synthese. Darunter fällt auch die allylische Oxidation, welche die Oxidation von Alkenen zu allylischen Alkoholen, allylischen Estern oder Enonen¹⁰¹ gestattet.¹⁰² Sie deckt ein weites Anwendungsspektrum ab und ist signifikant für zahlreiche industrielle Prozesse, denn dadurch können günstige olefinische Edukte in wertvolle Produkte umgewandelt werden.¹⁰³ Die erhaltenen Oxidationsprodukte sind attraktive synthetische Intermediate oder finden direkt Verwendung als Aromaverbindungen⁸³ und pharmazeutische Wirkstoffe.¹⁰⁴

Für die allylische Oxidation von Olefinen waren lange Zeit Chromreagenzien das Mittel der Wahl.^{105,106} CrO_3 ,^{107,108} $(t\text{-BuO})_2\text{CrO}_2$,¹⁰⁹ Na_2CrO_4 ,^{110,111} $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ¹¹² sind nur einige Beispiele für die verwendeten Reagenzien, welche in stöchiometrischen Mengen eingesetzt wurden.^{113,114}

Abbildung 10 zeigt Beispiele von zwei weiterentwickelten Reagenzien $\text{CrO}_3\text{-(py)}_2$ ¹¹⁵⁻¹¹⁷ und $\text{CrO}_3\text{-DMP}$.¹¹⁸ Diese Aminkomplexe wurden erfolgreich für die allylische Oxidation von Terpenen¹¹³ und Steroiden¹¹⁸ eingesetzt.

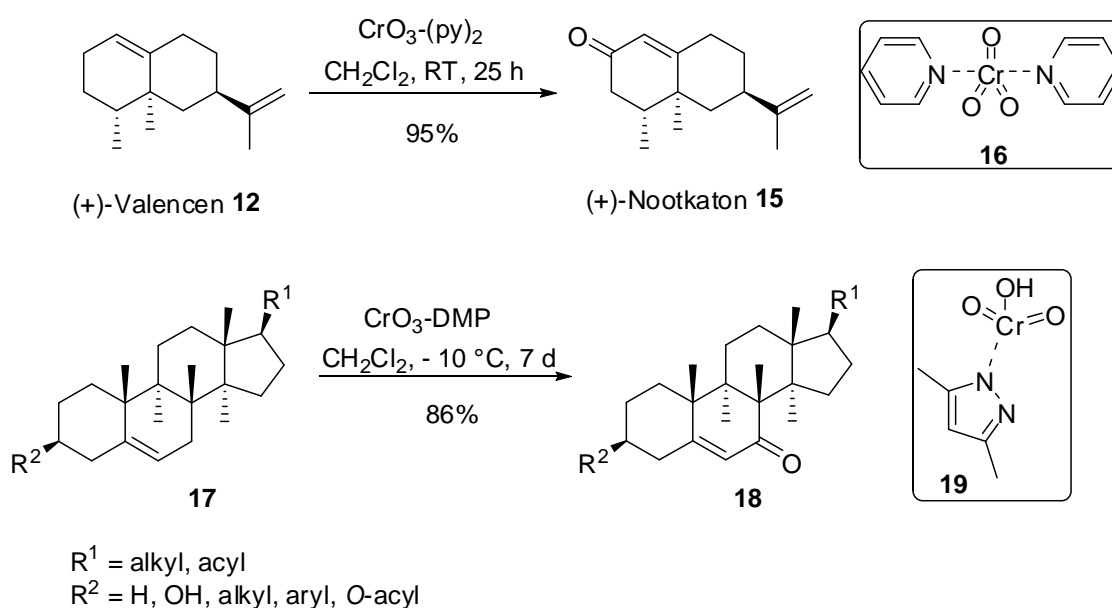


Abbildung 10: Allylische Oxidation von Valencen **12** mit $\text{CrO}_3\text{-(py)}_2$ in CH_2Cl_2 (dem sogenannten Collins-Reagenz) und Δ^5 -Steroiden **17** mit $\text{CrO}_3\text{-DMP}$.^{113,118}

Als effektive Reagenzien zur Darstellung von Enonen aus Olefinen erwiesen sich auch Pyridiniumchlorochromat (PCC) und Pyridiniumdichromat (PDC). Mit PCC, gelöst in DMSO, konnten gute Ausbeuten für die allylische Oxidation von Terpenoiden, wie zum Beispiel dem β -Ionon **26**,

erreicht werden.^{119,120} PDC wurde hingegen überwiegend für allylische Oxidationen von Δ^5 -Steroiden **17** verwendet.^{121,122}

Aufgrund der Toxizität von Chromreagenzien forschte man jedoch mit Hochdruck an katalytischen Verfahren, welche nicht mehr so große Mengen des Schwermetalls benötigten. Dabei fand in vielen Protokollen, zusätzlich zu den katalytischen Mengen an Chromreagenzien, noch das wässrige *tert*-Butylhydroperoxid (*t*-BuOOH) als eine sichere Sauerstoffquelle Verwendung.¹²³⁻¹²⁷

Zusätzlich zu den Chrom-katalysierten Protokollen wurde eine Vielzahl von Verfahren entwickelt, bei denen andere Metallkatalysatoren wie zum Beispiel Rhodium,¹²⁸⁻¹³⁴ Ruthenium,¹³⁵⁻¹⁴² Palladium,¹⁴³⁻¹⁵⁰ Eisen,¹⁵¹⁻¹⁵⁴ Kupfer,¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ Selen¹⁵⁸⁻¹⁶³ oder Kobalt¹⁶⁴⁻¹⁷¹ benutzt wurden.

Metallfreie allylische Oxidationen wurden ebenfalls zahlreich in der Literatur beschrieben. Mihelich und Eickhoff führten zum Beispiel photochemische allylische Oxidationen von verschiedenen Cycloalkenen durch.^{172,173} **Abbildung 11** zeigt diese Umsetzung am Beispiel von Cyclopenten **20**.

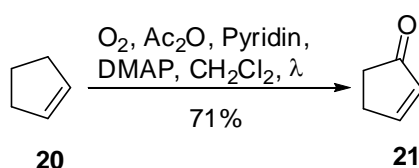


Abbildung 11: Photochemische allylische Oxidation von Cyclopenten **20 zu Cyclopentanon **21**.**¹⁷³

Auch verschiedene andere Oxidationsmittel wie zum Beispiel Natriumhypochlorit (NaOCl),¹⁷⁴ Natriumchlorit (NaOCl₂)¹⁷⁵ und Natriumperiodat (NaIO₄),¹⁷⁶ wurden, in Kombination mit *tert*-Butylhydroperoxid, erfolgreich zur Oxidation von einfachen Cycloalkenen oder Δ^5 -Steroiden verwendet. Als Oxidationsprodukte wurden dabei die korrespondierenden Enone erhalten. Aufgrund des besonderen Interesses der Lebensmittel- und Pharmaindustrie an allylischen Oxidationsprodukten erreichten auch einige biokatalytische Methoden eine große Aufmerksamkeit.¹⁷⁷⁻¹⁸² Zwei populäre Beispiele sind die Oxidation von Valencen **12** zu Nootkaton **15** mit dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus*⁹⁹ und die Oxidation von einfach ungesättigten Fettsäuren mit einer Lipoxygenase aus der Sojabohne.^{183,184}

Aufgabenstellung und Zielsetzung

Der neuartige Biokatalysator, das Lyophilisat des Basidiomyceten *Pleurotus sapidus*, sollte auf sein Anwendungspotenzial für das synthetisch, organische Labor untersucht werden.

In den vorangehenden Arbeiten wurde die katalytische Aktivität des Biokatalysators an einigen wenigen Substraten untersucht. Als Substrate wurden Terpene verwendet und die Umsetzung fand in einem mikromolaren Maßstab statt.^{84,99,185,186} In dieser Arbeit sollte zunächst eine Methode entwickelt werden, bei der so große Produktmengen erreicht werden können, dass eine Trennung und Identifizierung der Produkte gewährleistet werden kann. Um eine Vorstellung von der Substratspezifität des Biokatalysators zu erhalten, muss anschließend das Substratspektrum des Biokatalysators evaluiert werden. Die daraus gewonnen Erkenntnisse können außerdem dazu dienen, die Regio- und Stereoselektivität der Umsetzungen zu verstehen.

Auf den Grundlagen der Vorarbeiten sollten vorrangig weitere Terpene, welche das zur erfolgreichen Oxidation benötigte Strukturmotiv beinhalten, untersucht werden. **Abbildung 12** zeigt einige Beispiele von den ausgewählten Terpenen. Neuartige terpenoide Oxidationsprodukte sollten zudem olfaktometrisch geprüft werden, da sie möglicherweise ein interessantes Aromaprofil aufweisen könnten.

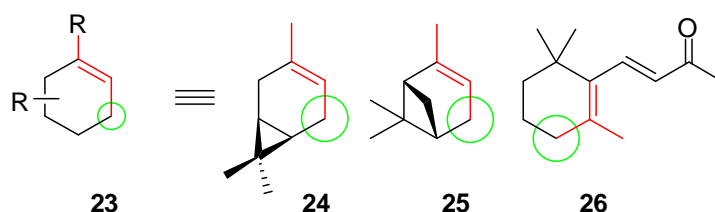


Abbildung 12: Beispiele für Terpene, welche das benötigte Strukturmotiv beinhalten und mit dem Lyophilisat des *Pleurotus sapidus* zur Strukturevaluierung umgesetzt werden sollten. Als Beispiele wurden 3-Caren **24**, α -Pinen **25** und β -Ionon **26** gewählt. Das benötigte Strukturmotiv ist rot und die allylische Position grün markiert.

Das weitere Ziel ist die Oxidation von einfachen Cycloalkenen, welche verschiedene Ringgrößen und Substituenten aufweisen. Bei den aromatischen Verbindungen **28** sollte geprüft werden, ob der Biokatalysator auch zur benzyllischen Oxidation in der Lage ist. Heterocyclische Verbindungen **29**, wobei die Art und die Position des Heteroatoms variieren können, sowie einfache acyclische Moleküle **30** sollten ebenfalls auf ihre Eignung als Substrate untersucht werden. **Abbildung 13** stellt die oben aufgezählten Gruppen schematisch dar.

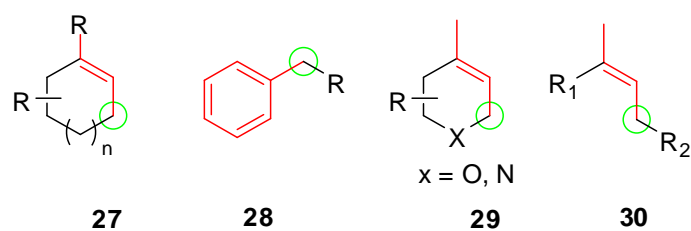


Abbildung 13: Schematische Darstellung verschiedener Molekülgruppen, welche zur Substratevaluierung des neuartigen Biokatalysators untersucht werden sollten. Bei den dargestellten Molekülen handelt es sich um Cycloalkene 27, Aromaten 28, Heterocyclen 29 und acyclische Moleküle 30.

Zur Demonstration des Synthesepotentials sollte der neuartige Biokatalysator außerdem in einigen ausgewählten organischen Synthesen eingesetzt werden.

Resultate und Diskussion

Kulturführung und Herstellung von Lyophilisaten

In dieser Arbeit wurde ein neuartiger Biokatalysator, das Lyophilisat des Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* auf seine Eignung für allylische Oxidationsreaktionen untersucht. *Pleurotus sapidus* ist ein naher Verwandter des Speisepilzes *Pleurotus ostreatus*, besser bekannt als Austernseitling.¹⁸⁷ Wie sein Verwandter ist auch dieser Pilz ungiftig, weshalb seine Kultivierung sicher und einfach ist, da keine besonderen Sicherheitsmaßnahmen getroffen werden müssen.

Die Anzucht der Vorkultur (4 Tage) und die weitere Vermehrung der Biomasse in der Hauptkultur (4 Tage) erfolgten submers in einem Standardnährmedium (SNL-Medium) nach der Vorschrift von Fraatz *et al.*¹⁸⁸ Anschließend wurde die Biofeuchtmasse mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und gefriergetrocknet. Dabei fand der Zellaufschluss zur Aktivierung des Transformationssystems statt. **Abbildung 14** zeigt eine schematische Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte.

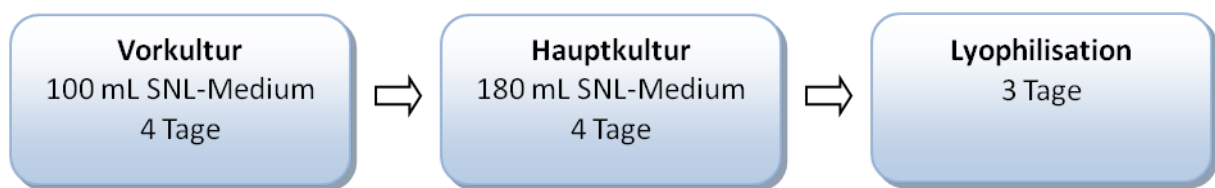


Abbildung 14: Herstellung des als Biokatalysator verwendeten Lyophilisats von *P. sapidus*.

Da das Lyophilisat trotz einer Temperatur von - 18 °C bei langer Lagerung an Aktivität verliert, wurde auf eine Anzucht der Masse in einem Rührkesselreaktor und damit auf eine größere Ansatzgröße verzichtet. Bei der Kultivierung im Erlenmeyerkolben erhält man zwar vergleichsweise wenig Biomasse, dafür ist eine lange Lagerung nicht notwendig. Bei Kultivierungsabständen von etwa zwei bis drei Monaten, hat man somit immer „frisches“ Lyophilisat für die Biotransformationen zur Verfügung. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass im Gegensatz zum Bioreaktor bei einer Kontamination nicht die gesamte Biomasse, sondern möglicherweise nur eine Charge, verworfen werden muss.

Methodenentwicklung

Scale-up und Optimierung der Lyophilisatmenge

Um den neuartigen Biokatalysator in einem organisch chemischen Labor nutzen und sein Substratspektrum evaluieren zu können, war zunächst ein Scale-up erforderlich.

Eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Biotransformation im Labormaßstab ist, dass eine ausreichende Menge an Substrat eingesetzt wird, um sicherzustellen, dass die Biotransformationsprodukte isoliert werden können. Dadurch kann zum einen die Ausbeute bestimmt werden und zum anderen kann die Struktur nicht literaturbekannter Verbindungen mittels NMR und HRMS ermittelt werden.

Für die ersten Biotransformationsversuche im Labormaßstab wurde die oben beschriebene Biotransformation des Sesquiterpens Valencen **12** zugrunde gelegt. Dabei wurden in einem 100 mL Kolben 50 mg (0.25 mmol) Valencen **12** durch unterschiedliche Mengen Lyophilisat für 20 h bei 25 °C biotransformiert. Das Ergebnis der Biotransformationen ist in **Abbildung 15** graphisch aufbereitet.

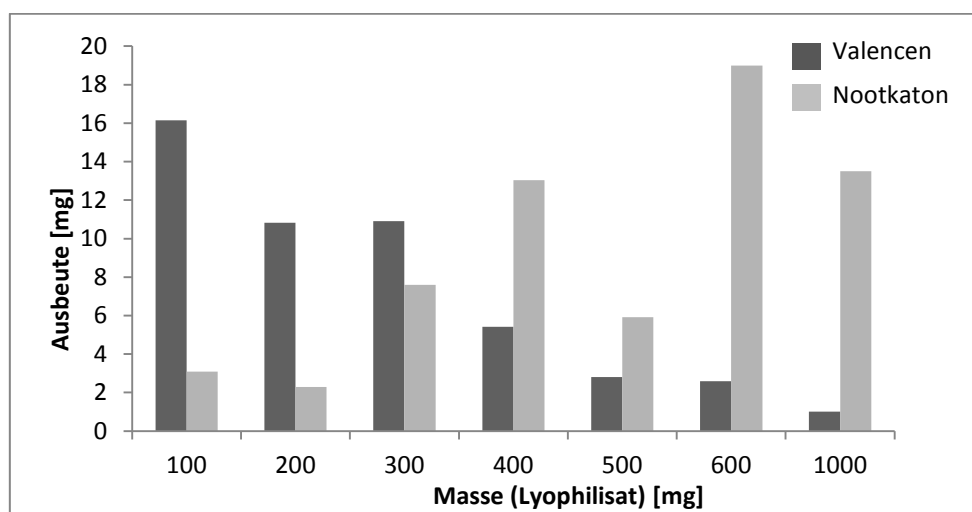


Abbildung 15: Vergleich der Biotransformationen von Valencen **12** zu Nootkaton **15** durch verschiedene Lyophilisatmengen.

Aufgrund der großen Mengen an Lyophilisat, die für diese Versuche notwendig waren, wurde lediglich eine Einfachbestimmung durchgeführt. Die Mengen von Valencen **12** und Nootkaton **15** wurden mittels GC-FID über den internen Standard Thymol quantifiziert. Wie man aus dem Diagramm erkennen kann, erreicht man die beste Umsetzung von Valencen **12** mit 600 mg Lyophilisat.

Die Ursache dafür, dass die Biotransformation mit 1000 mg Lyophilisat langsamer verlief, könnte in einer zu großen Lyophilisatdichte begründet liegen. Eine hohe Biomassendichte kann zu einer schlechteren Durchmischung und einem Sauerstoffmangel im Inneren des Kolbens führen. Dieser Erklärungsansatz konnte in einem weiteren Versuch bestätigt werden. Dabei wurde die Biotransformation von 50 mg (0.25 mmol) Valencen **12** zum einen in einem Rundkolben unter Durchmischung mit einem Magnetrührer und zum anderen in einem FalconTM- Tube, welches in einem Schüttler geschüttelt wurde, durchgeführt. Wie man aus der **Abbildung 16** erkennen kann, erfolgte im Rundkolben (im Chromatogramm rot markiert) eine zufriedenstellende Biotransformation von Valencen **12**, während im FalconTM- Tube (im Chromatogramm schwarz markiert) kaum eine Bildung von Nootkaton **15** beobachtet wurde.

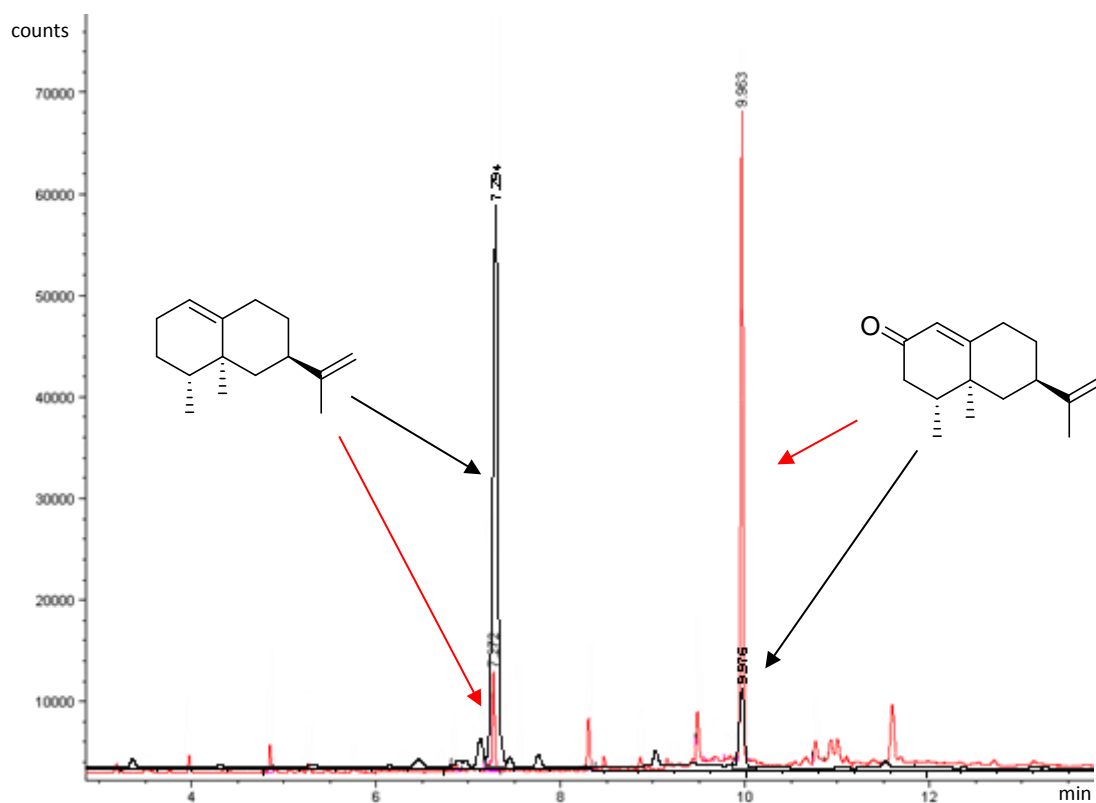


Abbildung 16: Biotransformation von Valencen **12**, welche im Rundkolben über einem Magnetrührer durchgeführt wurde (rotes Chromatogramm) und Biotransformation von Valencen **12** im FalconTM- Tube (schwarzes Chromatogramm).

Standardmethode

Die Standardmethode für eine Biotransformation wurde auf Basis der oben beschriebenen Versuche entwickelt. Die Menge an Lyophilisat wurde auf 600 mg und die Puffermenge auf 30 mL Tris-HCl-Puffer (20 mM, pH 7,5) festgelegt. Die Reaktionsbedingungen wie Temperatur (25 °C) und Puffereigenschaften wurden den Literaturdaten^{99,188} entnommen und bewegten sich in dem Bereich, in dem das Lyophilisat die höchste Aktivität zeigte. Zu Beginn jeder neuen Versuchsreihe betrug die Ansatzgröße 0.25 mmol, bezogen auf das neue Substrat. War das Ergebnis unter diesen Bedingungen zufriedenstellend, konnte die Substratmenge bis auf 1 mmol gesteigert werden. Die Reaktionsdauer betrug 3 Tage. Es hatte sich auch gezeigt, dass eine Zugabe von zusätzlichen 200 mg Lyophilisat nach 24 h höhere Ausbeuten lieferte. Dies war jedoch nicht bei jeder Biotransformation erforderlich.

Abbildung 17 zeigt schematisch die standardisierte Vorgehensweise für die Biotransformation.

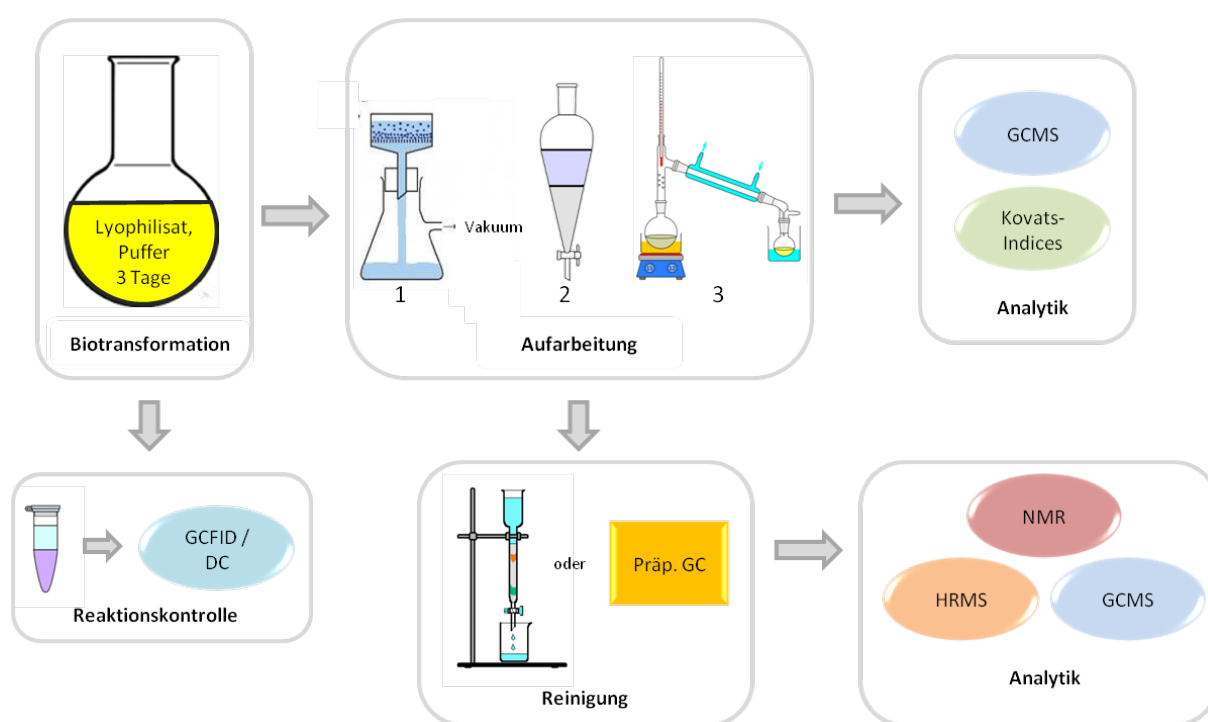


Abbildung 17: Standardmethode zur Durchführung der Biotransformation mit dem Lyophilisat des *P. sapidus*.

Obwohl die Dauer der Biotransformation auf 3 Tage festgesetzt wurde, muss betont werden, dass für einige Substrate unter Umständen auch eine kürzere Reaktionsdauer ausgereicht hätte. Die Reaktionsdauer von 3 Tagen sollte aber sicherstellen, dass bei der Mehrzahl der verwendeten Substrate eine bestmögliche Umsetzung erreicht wurde.

Während der Biotransformation wurden in regelmäßigen Abständen Reaktionskontrollen durchgeführt. Dazu wurden 0,5 mL der Reaktionsmasse entnommen und mit Et₂O/Pentan (1,5 mL, v/v 1:1) extrahiert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Argonstrom wurde die Probe mittels GC-FID analysiert. Die Reaktionskontrollen waren notwendig, um mögliche Zwischenprodukte zu ermitteln und zu identifizieren.

Nach beendeter Biotransformation wurde das Reaktionsgemisch aufgearbeitet. Die drei wesentlichen Arbeitsschritte bestanden darin, das Lyophilisat zu entfernen, die Biotransformationsprodukte aus dem wässrigen Puffer zu extrahieren und anschließend das verwendete Lösungsmittel zu entfernen.

Ein großes Problem beim Entfernen der Biomasse stellte die Flüchtigkeit mancher niedrig siedender Produkte dar. Diese Tatsache verringerte die Ausbeuten bei der Anwendung einer Vakuumfiltration teilweise erheblich. Eine andere Möglichkeit, das Lyophilisat zu entfernen bestand nicht, denn aufgrund seiner Beschaffenheit waren zahlreiche Versuche dieses über eine Druckfiltration zu entfernen erfolglos. Hierbei waren die verwendeten Fritten oder Filter schon nach kurzer Zeit undurchlässig. Aus demselben Grund war auch die Extraktion der Reaktionsprodukte mittels einer Soxhlett-Extraktion nicht durchführbar, denn die Extraktionshülse setzte sich ebenfalls nach kürzester Zeit zu. Eine weitere Ursache für die geringe Ausbeute könnte mit der Beschaffenheit des Lyophilisates in Verbindung stehen. Dieses aggregierte bei Kontakt mit organischen Lösungsmitteln stark und bildete einen klumpigen Brei. Diese Tatsache erschwerte das Auswaschen der Produkte mit Et₂O während der Vakuumfiltration stark.

Bei der anschließenden Extraktion der Produkte aus dem Puffermedium mit Hilfe eines Scheidetrichters ergab sich ein weiteres Problem. Da es sich bei dem verwendeten Lyophilisat um ein Ganzzellsystem handelt, enthält der Extrakt neben den gewünschten Biotransformationsprodukten auch Zellbestandteile wie zum Beispiel Pilzaromen, Lipide und Tenside. Die Tenside führen zu einer starken Schaumbildung, was ein wesentliches Problem bei der Extraktion darstellt. Der Einsatz von Entschäumern kam aber nicht in Frage, da diese möglicherweise die anschließende chromatographische Reinigung der Produkte beeinträchtigen könnten.

Bei leichtflüchtigen Produkten musste für die destillative Entfernung des Lösungsmittels eine Vigreux-Kolonne zu Hilfe genommen werden.

Nach der abgeschlossenen Aufarbeitung konnten zwei Vorgehensweisen zur Identifizierung der Produkte herangezogen werden. Zum einen konnten die Reaktionsprodukte anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indices mit den Literaturdaten, identifiziert werden. Die Voraussetzung hierfür war, dass die Produkte literaturbekannt sind. Bei

nicht literaturbekannten Produkten wurde das Rohprodukt zunächst chromatographisch gereinigt und die so isolierten Produkte konnten mittels NMR und HRMS identifiziert werden. Der Vorteil der zweiten Methode liegt unter anderem in der einfachen Ausbeutebestimmung.

Das größte Problem bei den Biotransformationen stellten die niedrigen Ausbeuten dar. Diese lassen sich aber nicht nur durch die hohe Flüchtigkeit der Produkte und den damit verbundenen Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung erklären. Auch darf man nicht außer Acht lassen, dass das Lyophilisat ein komplexes Enzymgemisch darstellt. Es besteht somit die Möglichkeit, dass auch Bindungen gespalten werden könnten und somit kann ein Teil des Substrats, aber auch des Produkts zersetzt werden.

Kontrollexperimente

Um zu überprüfen, ob tatsächlich das vermutete Enzymsystem für die jeweiligen Oxidationsreaktionen verantwortlich ist und um einen autooxidativen Beitrag des verwendeten Transformationspuffers auszuschließen, wurden für jedes neue Substrat zwei verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt. Das erste Kontrollexperiment wurde mit thermisch inaktiviertem Lyophilisat (100 °C, 2 h), welches keine Enzymaktivität mehr zeigte, durchgeführt. Bei dem zweiten Kontrollexperiment wurde auf die Zugabe von Lyophilisat verzichtet und das Substrat lediglich im Tris-HCl-Puffer gerührt.

Mit einigen ausgewählten Substraten wie zum Beispiel 3-Caren **24**, β -Ionon **26** und Citronellal **86** wurde ein drittes Kontrollexperiment durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob oder wie leicht diese Verbindungen mit dem Oxidationsmittel H_2O_2 (30%, 3 Äq.) reagiert. Bei allen drei Verbindungen wurde nach H_2O_2 -Zusatz keine Bildung von Oxidationsprodukten beobachtet. Diese Beobachtung kann durch die Studien von Fraatz an Valencen **12** mit H_2O_2 gestützt werden.¹⁸⁸

Toleranz von organischen Reaktionsmedien

Mikroorganismen wie Pilze oder Bakterien tolerieren nur selten große Mengen an organischen Verbindungen wie zum Beispiel organische Lösungsmittel.¹⁸⁹ Im Allgemeinen wird angenommen, dass die Toxizität der Lösungsmittel mit deren Einbau in die Lipidmembran der Zellen zusammenhängt. Dabei werden wesentliche Membranfunktionen zerstört, was zum Verlust der Permeabilität und schließlich zum Zelltod führen kann.¹⁹⁰ Die antimikrobielle Wirkung von Lösungsmitteln hängt stark von dem Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P_{ow}$) ab. Generell gelten Lösungsmittel mit einem niedrigen $\log P_{ow}$ als extrem toxisch, während Lösungsmittel mit höheren $\log P_{ow}$ -Werten als weniger toxisch angesehen werden.¹⁹¹

Die Verwendung von Lyophilisaten als Biokatalysatoren hat, im Gegensatz zu lebenden Organismen, einen entscheidenden Vorteil, denn bei dem Gefriertrocknungsprozess werden die Zellen zerstört, das intrazelluläre Enzymsystem wird freigesetzt und kann zur Katalyse verwendet werden. Viele Enzyme sind in der Lage, große Mengen an organischen Lösungsmitteln zu tolerieren. Einige zeigen dabei sogar interessante Eigenschaften wie eine erhöhte Stabilität¹⁹² oder sie sind in der Lage, Reaktionen zu katalysieren, welche in Wasser schwierig oder unmöglich sind.¹⁹³ Darüber hinaus kann sich die Enzymselektivität ebenfalls von der in Wasser unterscheiden oder sich sogar umkehren, wenn man von einem Lösungsmittel zu einem anderen übergeht.¹⁹⁴ Die „nichtwässrige Enzymologie“ ist inzwischen ein wichtiger Bestandteil der Forschung und der biotechnologischen Entwicklung.^{195,196} In zahlreichen qualitativen Versuchen hat sich herauskristallisiert, dass auch das Lyophilisat von *P. sapidus* in der Lage ist größere Mengen (bis zu 10 mL / 600 mg Lyophilisat) an verschiedenen organischen Lösungsmitteln, ohne große Aktivitätsverluste, zu tolerieren (**Abbildung 18**).

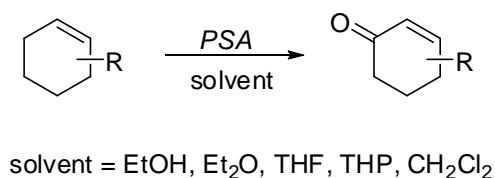


Abbildung 18: Organische Lösungsmittel welche bei der Biotransformation mit dem Lyophilisat von *P. sapidus* ohne Aktivitätsverlust verwendet werden können.

Gerade bei einer möglichen Anwendung des Biokatalysators im organisch synthetischen Labor ist diese Tatsache von großer Bedeutung, denn so besteht die Möglichkeit, auch lösemittelhaltige Vorstufen mit dem Lyophilisat umzusetzen. Dies ist besonders bei flüchtigen Vorläuferverbindungen ein Vorteil.

Die nachfolgenden GC-FID-Spektren zeigen jeweils zwei Beispiele für eine erfolgreiche Biotransformation von Valencen **12** zu Nootkaton **13** mit dem Lyophilisat des *P. sapidus*. Im Unterschied zu einer klassischen Biotransformation wurden hierbei Gemische aus Tris-HCl-Puffer/EtOH (2:1) (**Abbildung 19**) und Tris-HCl-Puffer/CH₂Cl₂ (10:1) (**Abbildung 20**) als Biotransformationsmedien verwendet.

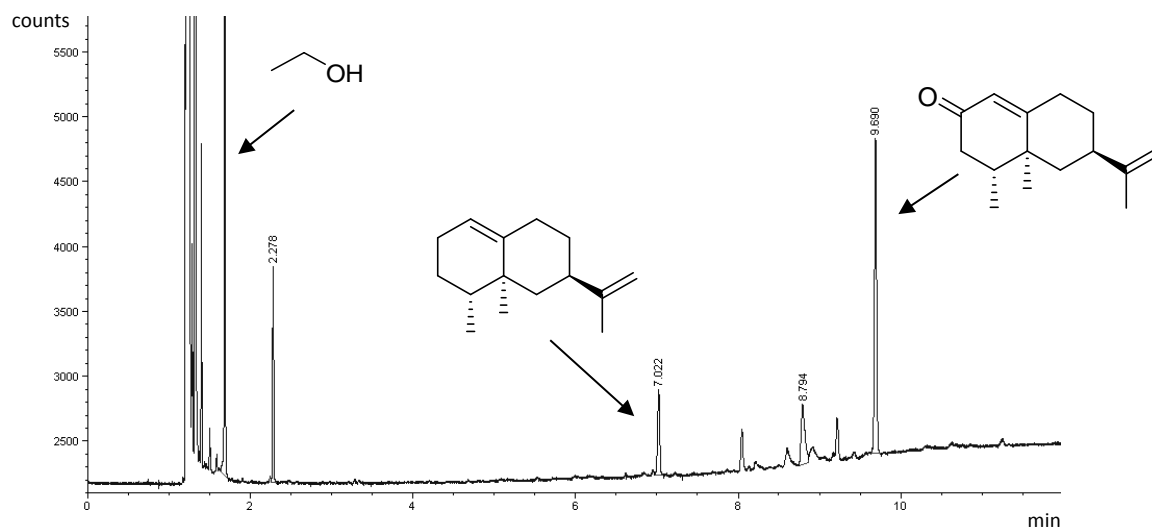


Abbildung 19: GC-FID-Chromatogramm der Biotransformation von Valencen 12 in einem Tris-HCl-Puffer / EtOH-Gemisch (2:1).

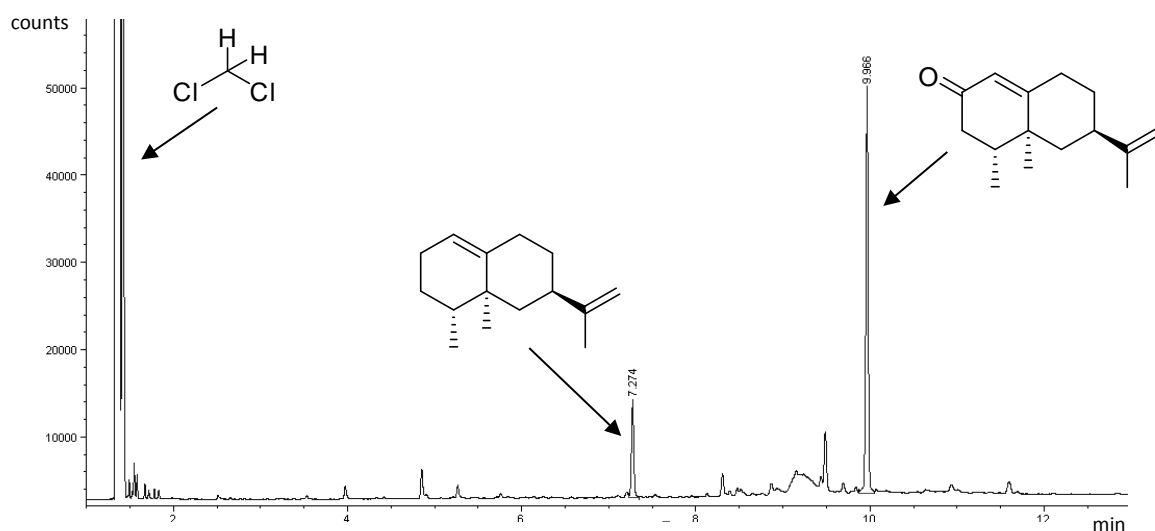


Abbildung 20: GC-FID-Chromatogramm der Biotransformation von Valencen 12 in einem Tris-HCl-Puffer / CH_2Cl_2 -Gemisch (10:1).

Eine grundsätzliche Herausforderung für die Anwendung von Biokatalysatoren in der organischen Synthese liegt in der Hydrophobizität vieler Reagenzien und der traditionellen Beschränkung der Biokatalyse auf wässrige Medien. Durch die Toleranz zahlreicher organischer Lösungsmittel ist dieser Biokatalysator möglicherweise geeignet die Katalyse in einem Mehrphasensystem durchzuführen. Die Vorteile hierfür wären, dass die meist hydrophoben Produkte sich in der organischen Phase anreichern. Somit lassen sich insgesamt hohe Reagenzkonzentrationen erreichen. Weitere Vorteile liegen in der Verminderung von Substrat- und Produktinhibierung der Enzymreaktion und in der potenziell vereinfachten Produktisolierung aus der organischen Phase.

Biotransformation von Terpenen

Die oxidative Funktionalisierung von cyclischen Olefinen hat eine große industrielle Bedeutung, denn dadurch besteht die Möglichkeit, aus kostengünstigen und leicht erhältlichen Substraten wertvolle Intermediate für die chemische Synthese zu erhalten. Terpene sind in der Natur weit verbreitet und ihre Oxidationsprodukte finden häufig Verwendung als Startmaterial in der Herstellung von Aromen oder pharmazeutischen Wirkstoffen.

Die Biotransformation von Terpenen repräsentiert eine attraktive Alternative zur chemischen Produktion von Aromen, denn diese findet unter milden Bedingungen statt und es entstehen keine giftigen Abfallprodukte.¹⁹⁷ Die so hergestellten natürlichen Aromen können als Duftstoffe oder Geschmacksverstärker in der Industrie eingesetzt werden.^{10,52} Bei den literaturbekannten Biotransformationen mit dem Basidiomyceten *P. sapidus* handelt es sich um Transformationen von Terpenen wie Valencen **12**,⁹⁹ Limonen **33**¹⁸⁶ oder Farnesen.¹⁹⁸ Basierend auf diesen guten Erfahrungen wurden in dieser Arbeit zahlreiche Terpene ausgewählt, um sie mit dem Lyophilisat von *P. sapidus* im Labormaßstab umzusetzen. Wichtige Kriterien für eine erfolgreiche Biotransformation sind das Vorhandensein einer oder mehrerer Doppelbindungen und eine freie allylische Position.

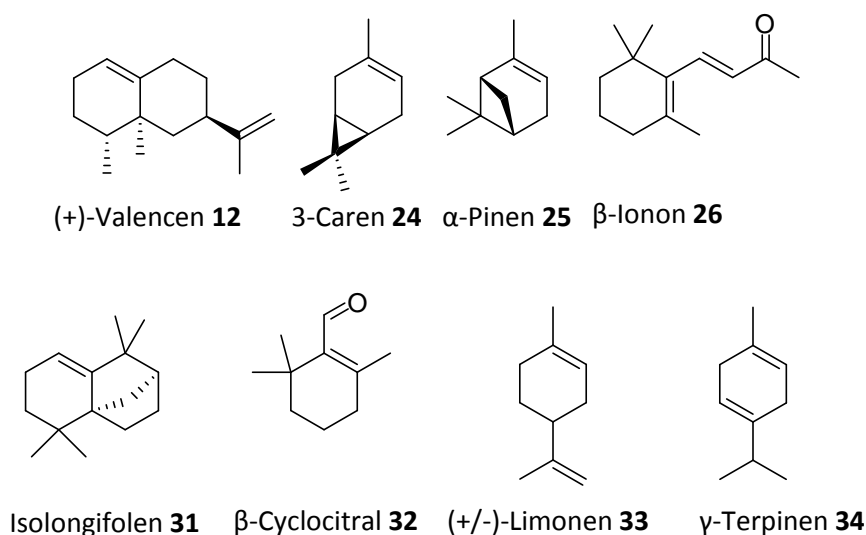


Abbildung 21: Ausgewählte Terpene für die Biotransformation mit dem Lyophilisat von *P. sapidus*.

Biotransformation von (+)-Valencen **12**

Das bicyclische Sesquiterpen (+)-Valencen **12** ist neben Limonen **33**, Myrcen **95** und Linalool ein Bestandteil der für die Riechstoffindustrie mengenmäßig sehr bedeutenden Orangenschalenöle (bis zu 1,5% bei Valencia-Orangen).⁷⁹ (+)-Valencen **12** konnte erfolgreich durch das Lyophilisat von *P. sapidus* oxidiert werden. Die Biotransformation dauerte 3 Tage und es wurden 600 mg Lyophilisat und 30 mL Puffer zur Umsetzung von 25 mmol Substrat eingesetzt.

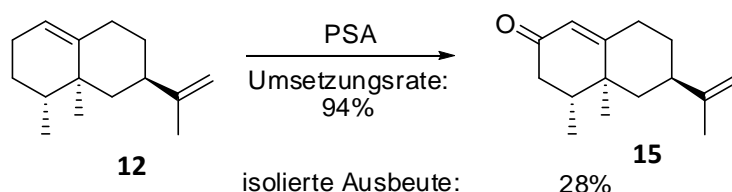


Abbildung 22: Biotransformation von (+)-Valencen **12** mit dem Lyophilisat von *P. sapidus*.

Bei der Biotransformation erhielt man laut dem Gaschromatogramm ein Hauptprodukt, welches nach der säulenchromatographischen Reinigung als das Nootkaton **15** (28% Ausbeute) identifiziert wurde.

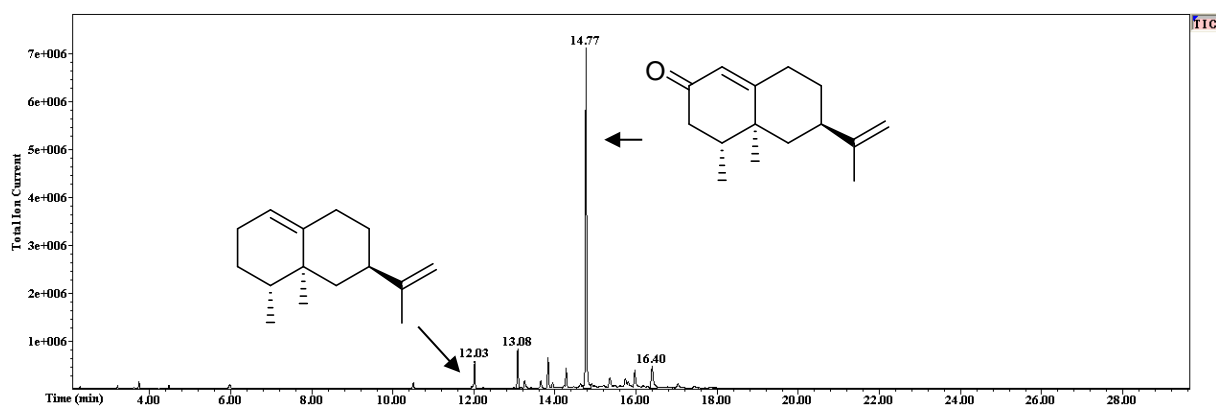


Abbildung 23: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von (+)-Valencen **12**.

Die beiden in der Literatur beschriebenen allyischen Alkohole α -Nootkatol **13** und β -Nootkatol **14** entstanden in so geringen Mengen, dass sie nur in Spuren (< 2%) isoliert werden konnten. Die geringe Ausbeute an Nootkaton **15** lässt sich mit der hohen Flüchtigkeit dieser Verbindung erklären. Bei einem Versuch, das Rohprodukt mittels präparativer GC zu reinigen, konnte das nach Grapefruit riechende Nootkaton **15**, selbst bei starker Kühlung mit Trockeneis, nicht in dem Auffanggefäß zurückgehalten werden.

Biotransformation von 3-Caren **24**

3-Caren **24** ist ein Bestandteil eines ätherischen Öls aus den tropischen Pinienbäumen *Pinus roxburghii* und *Pinus longifolia* (55-65%). Das Monoterpen ist aber auch in Zitrusbäumen, Tannen und in einigen Wacholderarten zu finden.¹⁹⁹ Eine erwähnenswerte Tatsache ist, dass in der Literatur bereits eine Biotransformation von 3-Caren **24** mit dem Pilz *P. sapidus* beschrieben wurde, welche sehr erfolgreich verlief. Als Transformationssystem wurde allerdings nicht das Lyophilisat sondern das homogenisierte Pilzmycel verwendet, wobei drei Hauptprodukte 3-Caren-5-on **35**, 3-Caren-2-on und 2-Caren-4-on, gebildet wurden.¹⁸⁵

Die Biotransformation mit dem Lyophilisat von *P. sapidus* erfolgte nahezu vollständig und es bildete sich ein Hauptprodukt, welches nach säulenchromatographischer Reinigung als 3-Caren-5-on **35** mit einer Ausbeute von 25% isoliert (**Abbildung 24**) und mittels NMR identifiziert werden konnte.

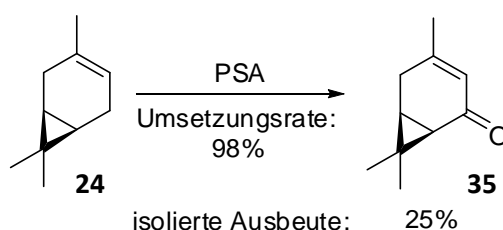


Abbildung 24: Biotransformation von 3-Caren **24** mit dem Lyophilisat von *P. sapidus*.

Im Gaschromatogramm (**Abbildung 25**) sind noch einige wenig intensive Peaks erkennbar. Diese Substanzen konnten aber weder isoliert, noch durch den Vergleich der Massenspektren oder durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten identifiziert werden. Anhand der Massenspektren und der literaturbekannten Kovats-Indizes konnte aber eindeutig ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesen Substanzen um Oxidationsprodukte wie zum Beispiel 3-Caren-2-on, 2-Caren-4-on, die möglichen allylischen Alkohole oder das Epoxid handelt.

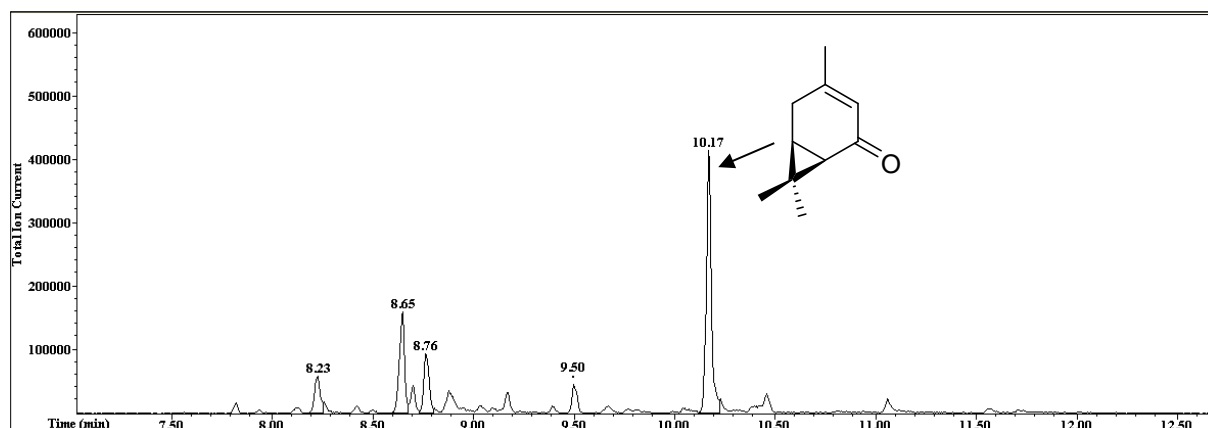


Abbildung 25: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von 3-Caren **24**.

Biotransformation von α -Pinen **25**

α -Pinen **25** ist neben β -Pinen und δ -Pinen eines der drei Pinenisomere. Pinene sind Bestandteile vieler ätherischer Öle und kommen in Myrte, Fichtennadeln, Dill, Fenchel, Koriander und Kümmel vor.²⁰⁰ Sie sind einer der Hauptbestandteile von Terpentinöl, welches bis zu 60% aus α -Pinen **25** besteht. Insbesondere α -Pinen **25** hat eine große Bedeutung als Vorstufe für die Herstellung von Düften und Aromen. Aus diesem Grund sind in der Literatur bereits zahlreiche Biotransformationsversuche beschrieben, wobei verschiedene Mikroorganismen Verwendung fanden.^{188,201-203} Ähnlich wie 3-Caren **24** wurde auch α -Pinen **25** bereits durch den Pilz *P. sapidus* biotransformiert, wobei überwiegend das Pilzmycel im Kulturmedium verwendet wurde.⁸⁴

Bei der Biotransformation von α -Pinen **25** mit dem Lyophilisat von *P. sapidus* bildeten sich zwei Hauptprodukte, welche nach säulenchromatographischer Reinigung als Verbenon **36** und *trans*-Verbenol **37** identifiziert werden konnten (Abbildung 26).

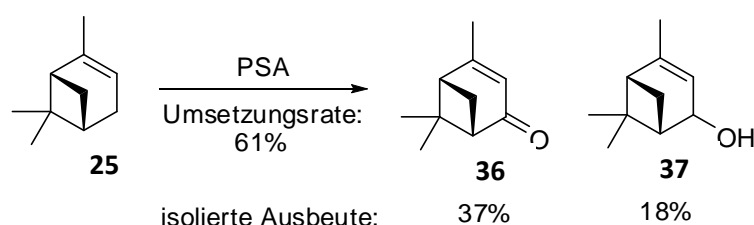


Abbildung 26: Biotransformation von α -Pinen **25** mit dem Lyophilisat von *P. sapidus*.

Verbenon **36** wurde mit einer Ausbeute von 37% isoliert und das *trans*-Verbenol **37** wurde mit einer Ausbeute von 18% erhalten. Die relative Stereochemie von *trans*-Verbenol **37** wurde anhand des 2D-NOESY-NMR eindeutig ermittelt (Abbildung 27).

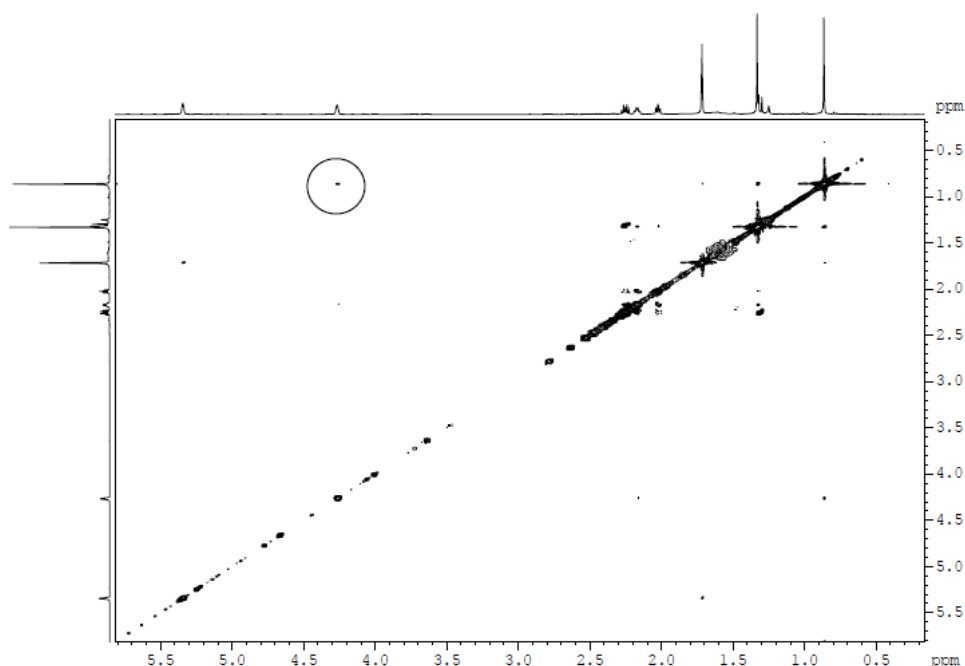


Abbildung 27: NOESY-Spektrum von *trans*-Verbenol **37**.

Verbenon **36** besitzt eine minzig-mentholische Note und wird als hochpreisiger natürlicher Duft- und Aromastoff gehandelt. *trans*-Verbenol **37** kommt unter anderem im Weihrauchbaum (*Boswellia sacra*) vor. Zudem sind die Biotransformationsprodukte Verbenon **36** und Verbenol **37** natürliche Insektenpheromone und besitzen ein hohes Anwendungspotenzial als umweltverträgliche Pestizide.^{204,205}

Regioselektivität

Bei der Biotransformation der drei zuvor diskutierten Verbindungen Valencen **12**, 3-Caren **24** und α -Pinen **25** entstanden hauptsächlich α,β -ungesättigte Carbonyle und Allylalkohole als Produkte. Diese drei cyclischen Terpene haben die 2-Methyl-2-Buten-Struktureinheit gemeinsam, welche in der **Abbildung 28** rot markiert wurde.

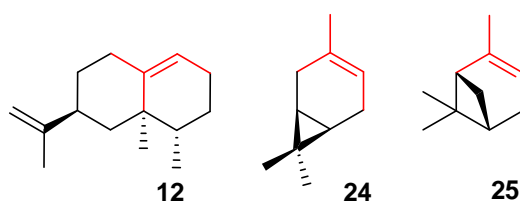


Abbildung 28: Strukturformeln von Valencen **12**, 3-Caren **24** und α -Pinen **25**. Die gemeinsame Struktureinheit ist rot markiert.

Dank weiterführender Studien von Weidmann *et al.*²⁰⁶ ist bekannt, dass die Oxidationsreaktion trotz des enzymatischen Ursprungs den Gesetzen einer Radikalreaktion folgt. Die Regioselektivität der Reaktion wird demnach stark durch die Bindungsdissoziationsenergien der vorhandenen allylischen CH-Bindungen und die sterische Zugänglichkeit bestimmt.

Allylische C-H Bindungen im Cyclohexen gelten als besonders labil. Zum Einen liegt es an ihrer besonderen räumlichen Anordnung, da sich das mesomeriestabilisierte Allylradikal bildet. Die Elektronen aus der π -Bindung delokalisieren in das halbleere Orbital. Zum anderen haben allylische C-H Bindungen von cyclischen Olefinen niedrigere BDH's als in acyclischen Olefinen. Ringspannung, Bindungsstärke aber auch die Resonanzenergie wurden als mögliche Gründe für die "cyclische Aktivierung" diskutiert.²⁰⁷ Aufgrund der vorteilhaften Orbitalwechselwirkung mit dem π -System werden axial-ständige Wasserstoffe leichter absorbiert als äquatorial ständige.²⁰⁸

Radikale welche zusätzlich an ein Sauerstoffatom grenzen, profitieren zum einen von den induktiven Effekten, aber auch von den Orbitalwechselwirkungen des Elektronenpaares des Sauerstoffatoms mit dem halb-gefüllten Orbital des hauptsächlich sp^2 -hybridisierten Radikals.²⁰⁹ Außerdem kann eine Alkylgruppe in allylischer Position, hauptsächlich durch Hyperkonjugation, zur Stabilisierung beitragen. Diese Effekte führen zu einer niedrigeren Bindungsdissoziationsenergie von etwa 80 kcal/mol.²⁰⁶

Die Stabilität der Radikale hängt auch maßgeblich von der Molekülstruktur ab. Höher substituierte Radikale sind stabiler als weniger substituierte. Deswegen spielt das tertiäre, olefinische Kohlenstoffatom eine besonders wichtige Rolle, dadurch wird das gebildete Allylradikal stärker durch Hyperkonjugation stabilisiert. Aus diesem Grund lässt sich die Regioselektivität der Produkte einfach vorhersagen. Dies wird an dem Beispiel der Biotransformation von 3-Caren **24** deutlich (Abbildung 29).

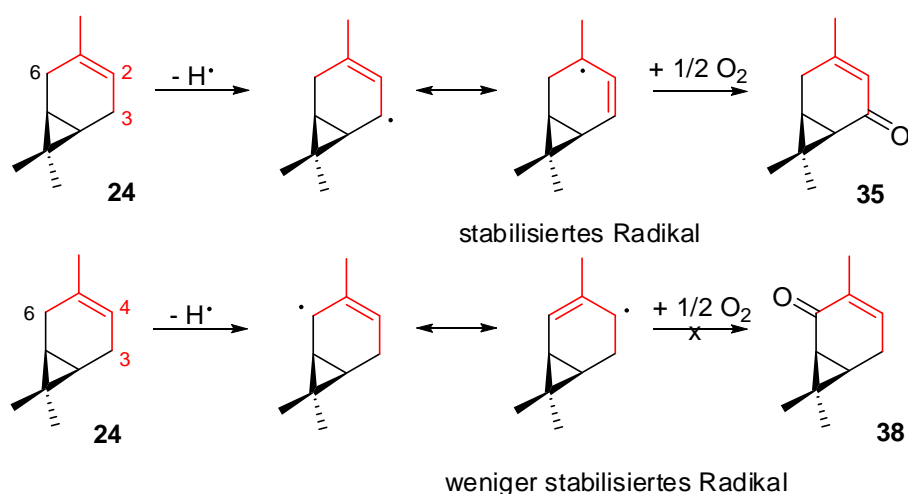


Abbildung 29: Zwei Beispiele für die radikalische, allylische Oxidation von 3-Caren **24**.

Biotransformation von β -Ionon 26

Die drei bekannten Iononisomere α -Ionon, β -Ionon **26** und γ -Ionon sind in Ölen diverser Pflanzen, insbesondere in Beeren, verschiedenen Teesorten und Tabak enthalten.²⁰⁷ β -Ionon **26** ist ein Abbauprodukt von β -Carotin^{208,209} und hat einen typischen veilchenartigen Geruch.²¹⁰

Die Biotransformation von β -Ionon **26** mit dem Lyophilisat von *P. sapidus* ergab ein Hauptprodukt, welches nach der säulenchromatographischen Reinigung als das β -Iononepoxid **39** identifiziert wurde (**Abbildung 30**). Die Ausbeute von β -Iononepoxid **39** betrug 36%.

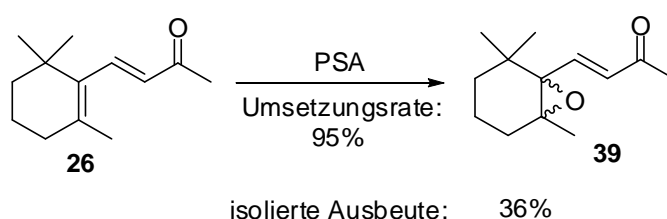


Abbildung 30: Biotransformation von β -Ionon **26** mit dem Lyophilisat von *P. sapidus*.

Interessanterweise bildete sich nicht das erwartete Enon als Hauptprodukt, sondern das Epoxid **39**. Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis könnte darin begründet liegen, dass das verwendete Lyophilisat eine Mischung verschiedener Enzyme enthält. Daher wäre es denkbar, dass ein anderes Enzym als bei den bereits besprochenen Biotransformationen die Oxidation von β -Ionon **26** katalysierte. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das Substrat katalytisch von dem im Lyophilisat vorhandenen H_2O_2 oxidiert wurde. Das durchgeführte Kontrollexperiment konnte diese Hypothese allerdings widerlegen. Dabei wurde das Substrat nur mit H_2O_2 (30%, 3 Äq) in Tris-HCl-Puffer bei RT für 24 h gerührt. Da β -Ionon **26** aber selbst durch so hohe Konzentrationen H_2O_2 nicht zum Epoxid oxidiert wurde, ist es weitgehend ausgeschlossen, dass das im Lyophilisat vorhandene H_2O_2 ausreicht, um das Epoxid **39** zu bilden.

Die Analyse von Verbindung **39** auf einer chiralen GC-Säule ergab, dass es sich bei dem Epoxid um ein Enantiomerengemisch (4% ee) handelt.

Die Bildung des Epoxides **39** ist eine spannende Entdeckung, denn die Epoxidierung von olefinischen Verbindungen zu den entsprechenden Epoxiden ist ein wichtiger Schritt in der Herstellung von Bulk-, Fein- und Pharmachemikalien.^{211,212} Außerdem sind Verbindungen mit dem 2,6,6-Trimethylcyclohexan Strukturmotiv vor allem im Bereich der Carotinoid-Chemie von großer Bedeutung,^{213,214} was die gezeigte Biotransformation besonders interessant macht. Das Epoxid **39** ist

zudem ein Modellmetabolit in der medizinischen Chemie und scheint ein effektiverer Inhibitor für die TPAⁱⁱ-Aktivität zu sein als seine Vorläuferverbindung β -Ionon.²¹⁶

Auch in der Synthese zahlreicher Aromastoffe ist das Epoxid **39** eine wichtige Vorläuferverbindung. Ein interessantes Beispiel ist die Synthese von Dihydroactinidiolid **111**, einer der Hauptkomponenten von Schwarztee aroma.²¹⁶

Biotransformation von (+/-)-Limonen **33**

Limonen **33** ist das in Pflanzen am häufigsten vorkommende Monoterpen. Es ist vor allem in Kümmelöl, Dillöl, Zitronenöl und Orangenöl zu finden^{217,218} und wird als preiswerter Aromastoff in zahlreichen Produkten verwendet.²¹⁹

Die Biotransformation von Limonen **33** mit dem Lyophilisat von *P. sapidus* erfolgte langsam und mit einer geringen prozentualen Umsatzrate von 18%. Das GC-MS-Chromatogramm ist in **Abbildung 31** dargestellt.

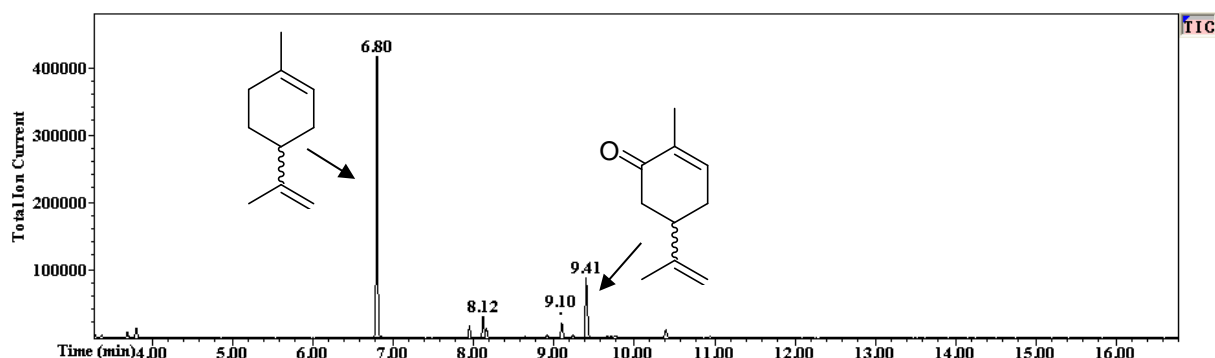


Abbildung 31: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von (+/-)-Limonen **33**.

Da aufgrund dieser geringen Umsetzungsraten eine säulenchromatographische Reinigung nicht erfolgversprechend erschien, wurde das Biotransformationsprodukt anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten identifiziert. Bei dem gebildeten Hauptprodukt handelte es sich um (+/-)-Carvon **40** (**Abbildung 32**).

ⁱⁱ TPA (tumor promoter agent) ist eine chemische oder biologische Verbindung, welche selbst nicht karzinogen ist, aber die Wirksamkeit von Karzinogenen steigert. (215) Tennant, R. *Environ. Health Perspect.* **1999**, 107, A390.

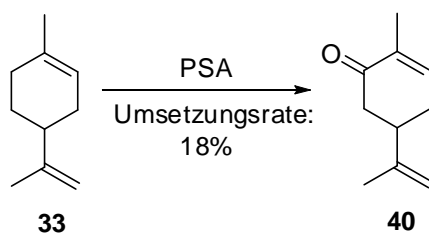


Abbildung 32: Biotransformation von (+/-)-Limonen **33** mit dem Lyophilisat von *P. sapidus*.

Wenn man allerdings davon ausgeht, dass die Oxidationsreaktion einem Radikalmechanismus folgt, müsste man anstelle des Carvons **40** die Bildung des Enons **41** erwarten, weil dessen Allylradikal stärker hyperkonjugativ stabilisiert wird (Abbildung 33).

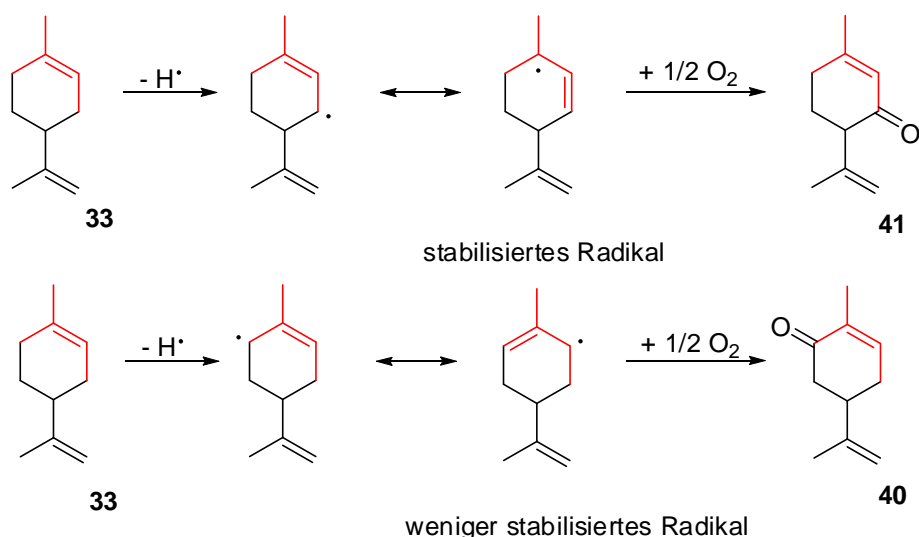


Abbildung 33: Zwei Beispiele für die radikalische allylische Oxidation von Limonen **33**.

Interessanterweise bildete sich im Fall der Biotransformation von Limonen **33** das Carvon **40** als Hauptprodukt. Auch Onken *et al.* beobachteten bei der Umsetzung von Limonen **33** durch Submerskulturen von *P. sapidus* die Bildung von (+/-)-Carvon **40** und zusätzlich dazu die Bildung von *cis/trans*-Carveol, wobei die Transformationsdauer bei 12 Tagen lag und das Substrat über die Gasphase zugegeben wurde.¹⁸⁶

Der Vergleich mit 3-Caren **24**, welches zu 3-Caren-5-on **35** oxidiert wurde, zeigt, dass die Regioselektivität zusätzlich durch die am Molekül vorhandenen Reste beeinflusst werden kann. (Abbildung 34).

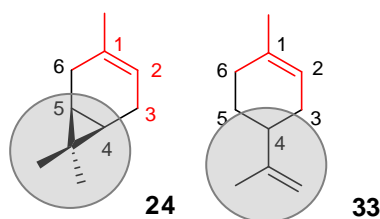


Abbildung 34: Strukturformeln von 3-Caren **24 und Limonen **33**.**

In dem Fall des Limonens **33** liegt der Substituent an C-4 direkt neben der allylischen Position C-3, welche dadurch sterisch gehindert wird. Vermutlich führt dieser Umstand zur Bildung von Carvon **40**. Die sterische Hinderung durch den Rest an C-4 könnte auch die lange Reaktionsdauer (welche bei Onken *et al.*¹⁸⁶ sogar 12 Tage betrug) und die schlechte Umsetzungsrate erklären. Da die im Molekül günstigere allylische Position (C-3) durch den Substituent an C-4 sterisch gehindert wird, erfolgt die Oxidation an der anderen Position (C-6), allerdings nur langsam und mit geringem Umsatz. Durch den Dimethylcyclopropan-Rest bei 3-Caren **24** hingegen unterscheiden sich die allylischen Positionen (C-3 und C-6) nicht stark voneinander, wodurch die Bildung von 3-Caren-5-on **35** wegen der möglichen Radikalstabilisierung begünstigt wird.

Biotransformation von (-)-Isolongifolen **31**

Isolongifolen **31** ist ein tricyclisches Sesquiterpen, welches vor allem durch die Isomerisierung von Longifolen erhalten wird.²²⁰ Longifolen wiederum ist reichlich im Terpentinöl der Himalaya-Kiefer vorhanden.²²¹ Oxidierte Derivate von Isolongifolen **31**, wie zum Beispiel Enone, Alkohole und Epoxide, haben wegen ihres extrem reichhaltigen Holz- und Blumenaromas eine große Bedeutung für die moderne Parfümindustrie.²²²

Die Biotransformation von (-)-Isolongifolen **31** erfolgte mit geringen prozentualen Umsetzungsraten von 37%. Das GC-MS-Chromatogramm ist in **Abbildung 35** dargestellt.

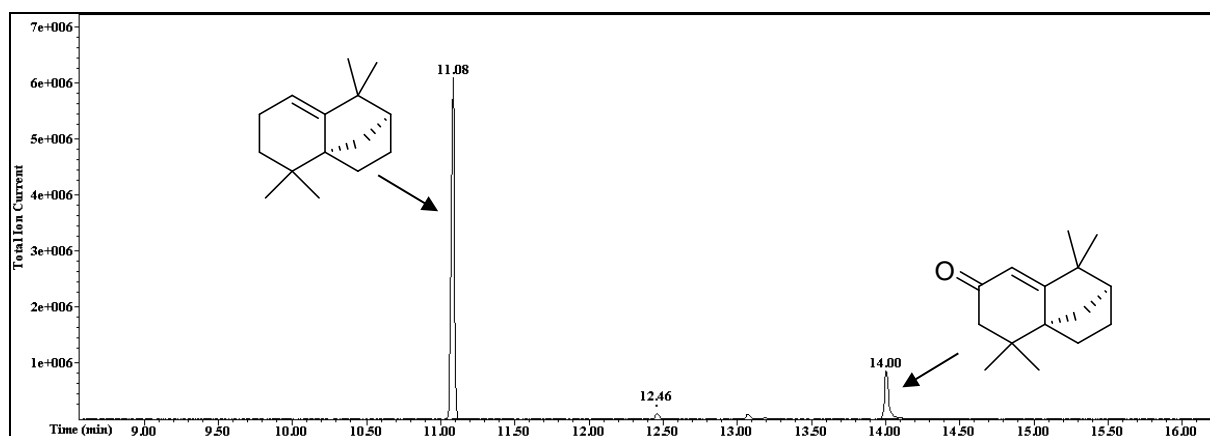


Abbildung 35: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von (-)-Isolongifolen 31.

Da auch in diesem Fall eine säulenchromatographische Reinigung aufgrund der geringen Umsetzungsrate nicht erfolgversprechend erschien, wurde das Biotransformationsprodukt anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten identifiziert. Bei dem gebildeten Hauptprodukt handelte es sich um (-)-Isolongifolen-9-on **42** (Abbildung 36).

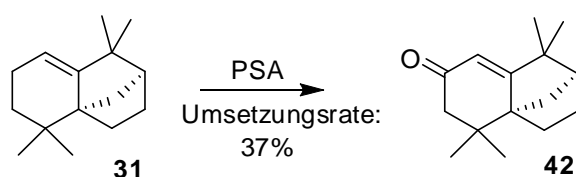


Abbildung 36: Biotransformation von (-)-Isolongifolen 31 mit dem Lyophilisat von *P. sapidus*.

Das Isolongifolen **31** besitzt nur eine freie allylische Position. Entsprechend entsteht bei der Biotransformation das erwartete Oxidationsprodukt. Als Ursache für die moderate Umsetzungsrate könnte die räumliche Struktur des Moleküls in Betracht gezogen werden. Isolongifolen **31** kann möglicherweise aufgrund von sterischen Faktoren nicht optimal an das aktive Zentrum des Enzyms binden.

Biotransformation von β -Cyclocitral 32

Im Folgenden wird die Biotransformation von β -Cyclocitral **32** diskutiert. Das eingesetzte Edukt wurde mit einer Umsetzungsrate von nahezu 90% fast vollständig umgesetzt. Das GC-MS-Chromatogramm ist in **Abbildung 38** dargestellt.

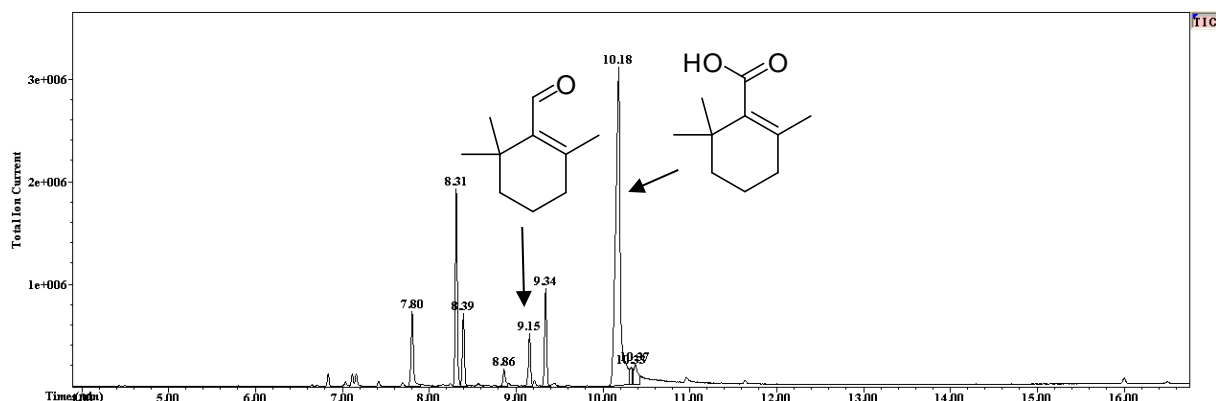


Abbildung 37: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von β -Cyclocitral **32**.

Da das Biotransformationsprodukt literaturbekannt war, wurde auf eine säulenchromatographische Reinigung verzichtet. Das Produkt konnte anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten identifiziert werden. Bei dem gebildeten Hauptprodukt handelte es sich um 1-Cyclohexen-1-Carbonsäure **43**, welche auch als α -Cyclogeraniumsäure bekannt ist (Abbildung 39).

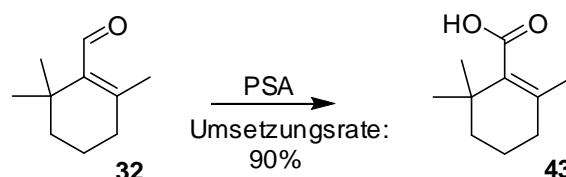


Abbildung 38 Biotransformation von β -Cyclocitral **32** mit dem Lyophilisat des *P. sapidus*.

Aldehyde sind reaktive Verbindungen und lassen sich sehr leicht zu Carbonsäuren oxidieren. Deswegen ist anzunehmen, dass die Oxidation auch durch andere, im Lyophilisat vorhandene Enzyme katalysiert werden könnte. Um zu bestätigen, dass die Reaktion tatsächlich enzymatischen Ursprungs war, wurde ein Vergleichsexperiment mit hitzeinaktiviertem Lyophilisat durchgeführt. Dabei wurde keine Oxidation von β -Cyclocitral **32** beobachtet.

Biotransformation von γ -Terpinen **34**

γ -Terpinen **34** ist eine natürlich vorkommende, kiefernartig duftende Verbindung, welche in vielen ätherischen Ölen, insbesondere denen von Zitrusfrüchten und Gewürzpflanzen, enthalten ist.²²³ Die Verbindung zeigt darüber hinaus eine antimikrobielle und entzündungshemmende Wirkung.²²⁴

Die Biotransformation von γ -Terpinen **34** war nach 24 h beendet und das eingesetzte Edukt wurde mit einer Umsetzungsrate von 99% vollständig umgesetzt. Es entstand nur ein einziges Hauptprodukt. Das GC-MS-Chromatogramm ist in **Abbildung 40** dargestellt.

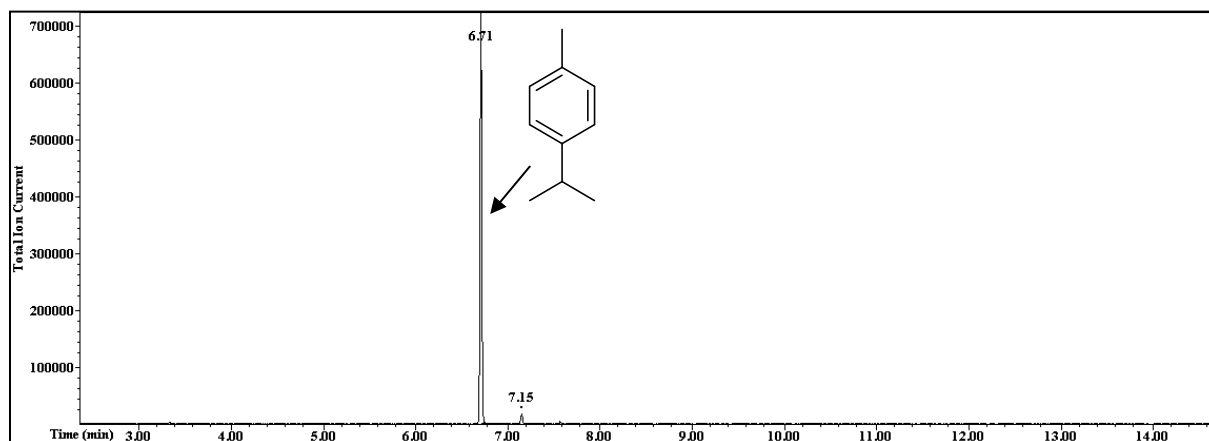


Abbildung 39: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von γ -Terpinen **34**.

Da in diesem Fall das Biotransformationsprodukt aufgrund der annähernd vollständigen Umsetzung bereits in akzeptabler Reinheit vorlag, konnte auf eine säulenchromatographische Reinigung verzichtet werden. Das Produkt wurde mittels GC-MS- und NMR-Analytik eindeutig als das *p*-Cymol **44** (**Abbildung 41**) identifiziert und es wurde mit einer Ausbeute von 39% erhalten.

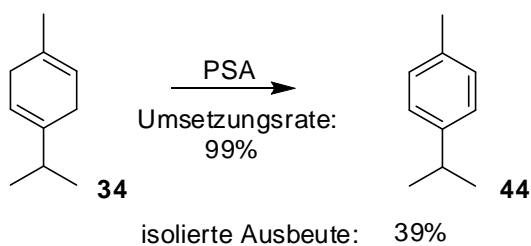


Abbildung 40: Biotransformation von γ -Terpinen **34** mit dem Lyophilisat des *P. sapidus*.

Eine mögliche Erklärung für die bevorzugte Bildung des Aromaten **44** anstelle eines Allylalkohols oder Enons ist die niedrigere Energie des aromatischen Systems.

Biotransformation von Cycloalkenen

Nachdem viele Terpene erfolgreich durch das Lyophilisat von *P. sapidus* oxidiert werden konnten, stellte sich die Frage, ob auch andere Verbindungen biotransformiert werden können. Da die bereits oben beschriebenen Terpene alle ein Cyclohexengrundgerüst besitzen, war es naheliegend zu überprüfen, ob sich auch Cyclohexen **45** als Substrat für die Biotransformation durch das Lyophilisat eignet. In einem weiteren Schritt sollte anschließend untersucht werden, ob sich kleinere und größere Cycloalkene wie z.B. Cyclopenten **20** und Cyclohepten **48** ebenfalls als Substrate in dieser Biotransformation einsetzen lassen.

Im Wesentlichen lassen sich die Ergebnisse der Biotransformationen dieser drei Cycloalkene kurz zusammenfassen, wobei die Biotransformationsprodukte jeweils anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten identifiziert wurden (**Abbildung 42**).

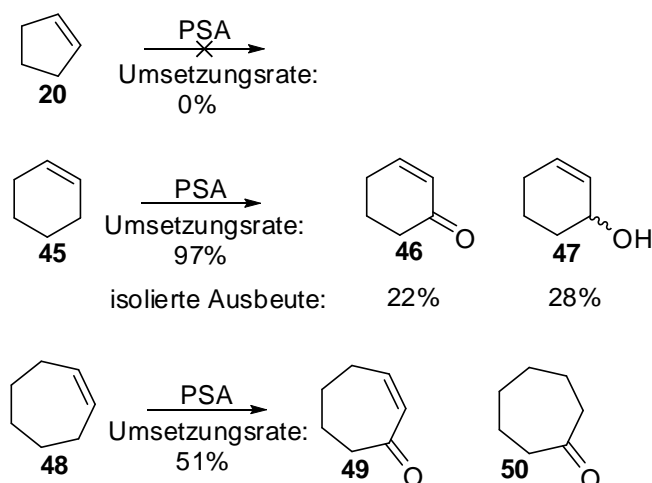


Abbildung 41: Biotransformationen der drei Cycloalkene: Cyclopenten **20**, Cyclohexen **45** und Cyclohepten **48**.

Wie man **Abbildung 42** entnehmen kann, wurde Cyclopenten **20** durch das Lyophilisat nicht umgesetzt. Daraus könnte man schlussfolgern, dass Verbindungen mit einem Cyclopentengrundgerüst möglicherweise keine geeigneten Substrate für das zu untersuchende Transformationssystem sind. Allerdings muss man bei negativen Ergebnissen mehrere Ursachen in Betracht ziehen. Große Probleme bereitete zum Beispiel der niedrige Siedepunkt von Cyclopenten **20**. Aufgrund der geringen Differenz zwischen den Siedepunkten der möglichen Produkte zu dem des Lösungsmittels war denkbar, dass die niedrigsiedenden Produkte bei der destillativen Entfernung des Lösungsmittels ebenfalls entfernt wurden. Darüber hinaus bestand die

Möglichkeit, dass die Biotransformationsprodukte im GC-Chromatogramm vom Lösungsmittelpeak überlagert wurden. Mit Hilfe der DC-Analytik konnte aber die letzte Annahme widerlegt werden. Denn auch dabei konnten keine möglichen Produktpots gefunden werden.

Cyclohexen **45** wurde erwartungsgemäß fast vollständig zu Cyclohexenon **46** und einem Isomerengemisch (3% ee) aus Cyclohexenol **47**, mit sehr guten Umsetzungsraten von 97%, biotransformiert (**Abbildung 43**).

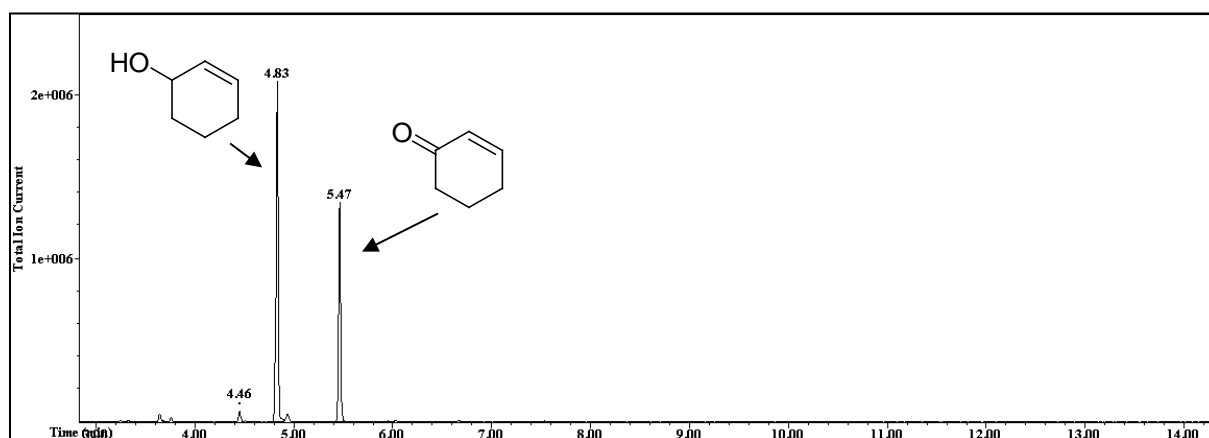


Abbildung 42: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von Cyclohexen **45**.

Cyclohepten **48** wurde zum Enon **49** und zusätzlich zum Keton **50** oxidiert. Da die Umsatzrate bei lediglich 51% betrug, ist in **Abbildung 44** noch ein deutlicher Eduktpeak zu erkennen. Bei der Bildung des Ketons **50** konnte zum ersten Mal eine Reduktion der Doppelbindung beobachtet werden.

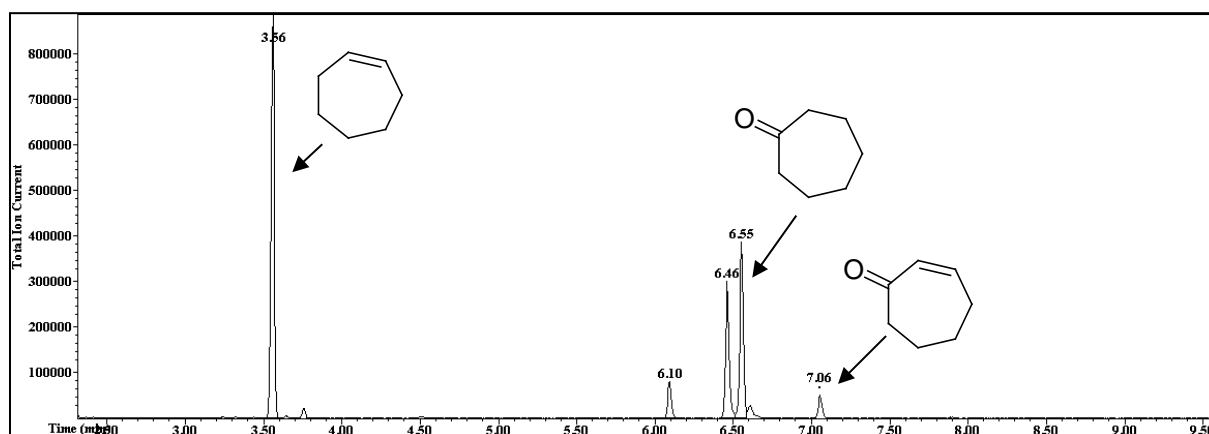


Abbildung 43: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von Cyclohepten **48**.

Bei den Biotransformationen von Cyclohexen **45** und Cyclohepten **48** ist anzumerken, dass nur eine einmalige Oxidation erfolgt, obwohl die beiden allylischen Positionen vor der Umsetzung chemisch vollständig äquivalent sind. Eine „Doppeloxydation“ konnte auch bei den Biotransformationen von Terpenen nicht beobachtet werden.

Biotransformation von Cyclohexenderivaten

Die vorherigen Versuche haben gezeigt, dass Moleküle mit einem Cyclohexengrundgerüst besser für Umsetzungen durch das Lyophilisat geeignet sind als Cycloalkene anderer Ringgröße. Im Folgenden sollte daher überprüft werden, ob sich die Biotransformation auch auf substituierte Cyclohexenderivate ausdehnen lässt.

Biotransformation von 1-*tert*-Butylcyclohexen **51**

Die Biotransformation von 1-*tert*-Butylcyclohexen **51** verlief mit guten prozentualen Umsetzungsraten von 80%. Das GC-MS-Chromatogramm ist in **Abbildung 45** dargestellt.

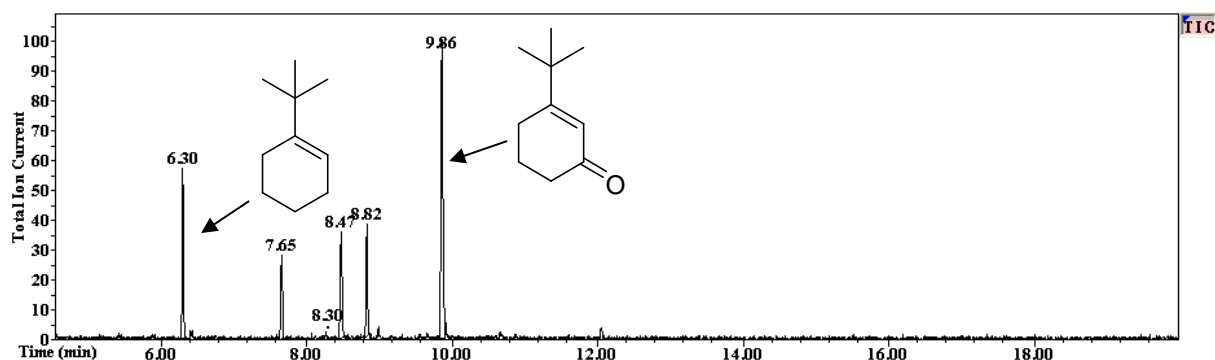


Abbildung 44: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von 1-*tert*-Butylcyclohexen **51**.

Da auch in diesem Fall das Biotransformationsprodukt literaturbekannt war und anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten ermittelt werden konnte, wurde auf eine säulenchromatographische Reinigung verzichtet. Bei dem gebildeten Hauptprodukt handelte es sich um 3-*tert*-Butylcyclohexen-1-on **52** (**Abbildung 46**). Die drei entstandenen Nebenprodukte konnten nicht zweifelsfrei identifiziert werden.

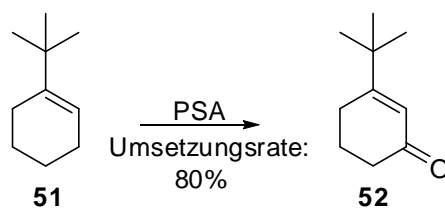


Abbildung 45: Biotransformation von 1-*tert*-Butylcyclohexen **51** mit dem Lyophilisat des *P. sapidus*.

Theoretisch hätten zwei mögliche Enone **52** und **53** entstehen können (Abbildung 47). Die Tatsache, dass vorzugsweise 3-*tert*-Butylcyclohexen-1-on **52** gebildet wurde, kann damit erklärt werden, dass die zweite allylische Position (C6) durch die sterisch anspruchsvolle *tert*-Butyl-Gruppe blockiert wurde.

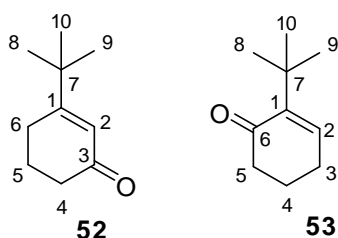


Abbildung 46: Gegenüberstellung der beiden möglichen Enone von 1-*tert*-Butylcyclohexen **51**.

Biotransformation von 1-Phenylcyclohexen **54**

Die Biotransformation von 1-Phenylcyclohexen **54** verlief mit sehr guten Umsetzungsrate von 97%. Allerdings bildete sich ein Produktgemisch (Abbildung 48).

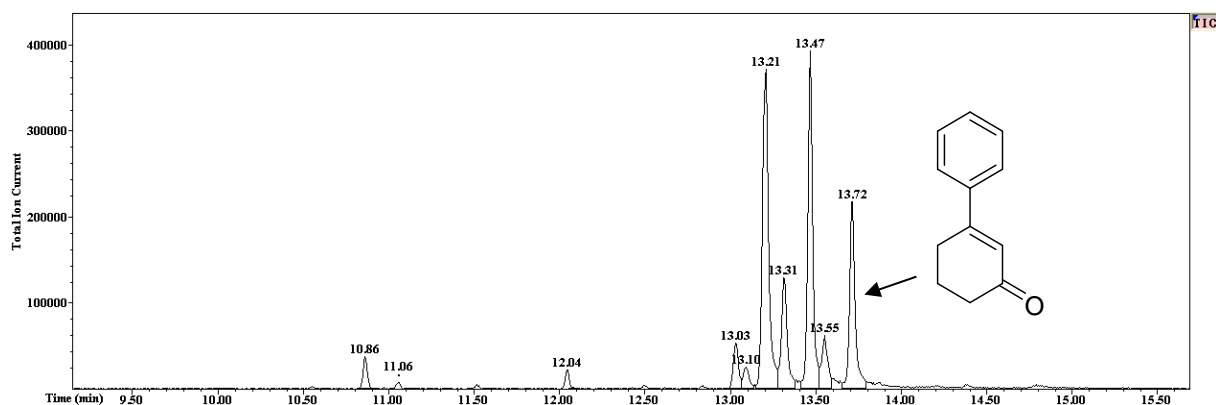


Abbildung 47: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von 1-Phenylcyclohexen **54**.

Durch den Vergleich der Fragmentierungsmuster mit den Literaturdaten konnte das Biotransformationsprodukt mit der Masse m/z : 172 eindeutig als das 1-Phenylcyclohexen-3-on **55** identifiziert werden (**Abbildung 49**).

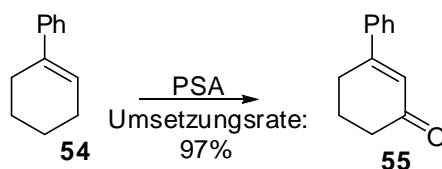


Abbildung 48: Biotransformation von 1-*tert*-Butylcyclohexen **54** mit dem Lyophilisat des *P. sapidus*.

Auch in diesem Fall ist die allylische Position in der Nachbarschaft zur sterisch anspruchsvollen Phenylgruppe blockiert, weswegen nur eine mögliche α , β -ungesättigte Verbindung gebildet werden kann.

Die zwei weiteren Hauptprodukte, beide mit der Masse m/z : 192 und einem sehr ähnlichen Fragmentierungsmuster, konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Höchstwahrscheinlich handelt es sich aber um die diastereomeren Diole.

Biotransformation der Methylcyclohexene 56, 57 und 58

Die Biotransformation der drei Methylcyclohexene **56**, **57** und **58** (**Abbildung 50**) wurde von Oliver Hamers im Rahmen seiner Bachelorarbeit bearbeitet.ⁱⁱⁱ

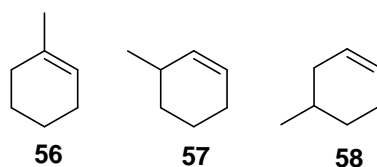


Abbildung 49: 1-Methylcyclohexen 56, 3-Methylcyclohexen 57 und 4-Methylcyclohexen 58.

Die Experimente konnten aufzeigen, dass die Methylgruppe nur eine geringe sterische Hinderung verursacht und somit keine Produktspezifität bewirkt. Dadurch ergeben die Methylcyclohexene **56**, **57** und **58** mehrheitlich Produktgemische der verschiedenen Oxidationsprodukte.

ⁱⁱⁱ Die Biotransformation der drei Methylcyclohexene **56**, **57** und **58** findet sich in der Bachelorarbeit von *Oliver Hamers* (Universität Gießen, „Evaluierung des Substratspektrums der enzymatischen allylischen Oxidation mit *Pleurotus sapidus*“, 2010)

Biotransformation von Aromaten

Aufgrund ihrer großen Anwendungsbreite in der Synthese von Pharma- und Feinchemikalien sind benzyliche Oxidationen, ähnlich wie allyliche Oxidationen, wichtige industrielle Prozesse.¹⁷⁵ Der aromatische Charakter wirkt sich nicht nur auf die aromatischen Kohlenstoffatome selbst, sondern auch auf die direkt benachbarten, benzylichen C-Atome aus. Die Reaktivität der benzylichen Position ist gut mit der der allylichen vergleichbar, zumal das p-Orbital des sp^2 -C-Atoms in einer benzylichen Spezies (Kation oder Radikal) mit dem p-Orbital des aromatischen C-Atoms in ähnlicher Weise überlappt, wie es für allyliche Spezies der Fall ist.

Um zu untersuchen, ob auch benzyliche Oxidationen mit dem Lyophilisat von *P. sapidus* möglich sind, wurden drei aromatische Substrate (**Abbildung 51**) ausgewählt und nach **AV 1** biotransformiert.

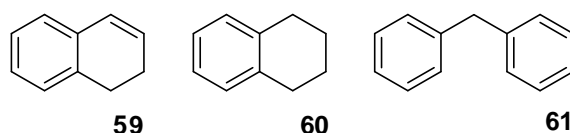


Abbildung 50: Die drei zur Biotransformation mit dem Lyophilisat von *P. sapidus* ausgewählten aromatischen Substrate 1,2-Dihydronaphthalin **59**, Tetrahydronaphthalin **60** und Diphenylmethan **61**.

Biotransformation von 1,2-Dihydronaphthalin **59**

Bei der Biotransformation von 1,2-Dihydronaphthalin **59** bildeten sich zwei Hauptprodukte. Die prozentuale Umsetzungsrate betrug 84%. Das GC-MS-Chromatogramm ist in **Abbildung 52** dargestellt.

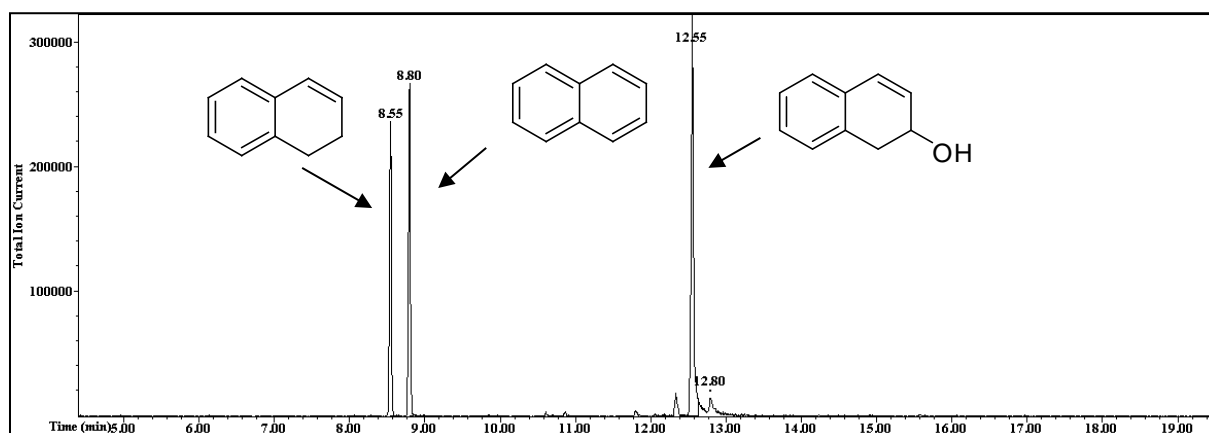


Abbildung 51: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von 1,2-Dihydronaphthalin **59**.

Anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten konnten die Produkte identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass das Substrat einmal an der allylische Position oxidiert wurde, wobei sich der Alkohol **63** bildete. Das zweite Hauptprodukt konnte als das Naphthalin **62** identifiziert werden (**Abbildung 53**).

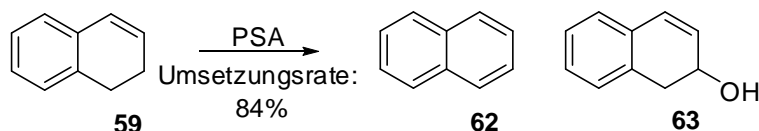


Abbildung 52: Biotransformation von 1,2-Dihydronaphthalin 59 mit dem Lyophilisat des *P. sapidus*.

Da das Molekül **59** sowohl ein allylisches als auch ein benzylisches C-Atom besitzt, ist es interessant zu beobachten, dass in diesem Fall die allylische Position bei der Biotransformation bevorzugt wird. Die Bildung von Naphthalin **62** ist vor allem mit dessen hoher aromatischer Stabilität zu erklären.

Biotransformation von Tetrahydronaphthalin 60

Bei der Biotransformation von Tetrahydronaphthalin **60** bildeten sich zwei Hauptprodukte. Die Reaktion verlief jedoch langsam und die prozentuale Umsetzungsrate betrug 43%. Das GC-MS-Chromatogramm ist in **Abbildung 54** dargestellt.

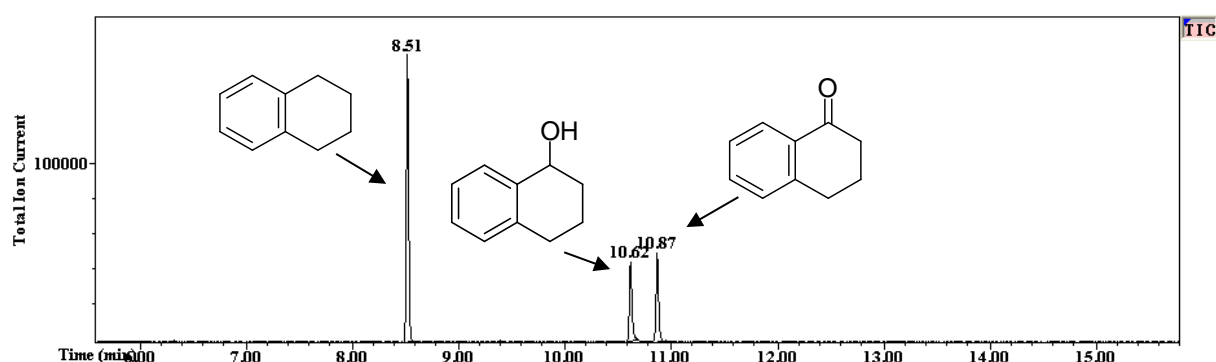


Abbildung 53: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von Tetrahydronaphthalin 60.

Durch den Vergleich der Massenspektren mit den Literaturdaten konnten die zwei Produkte als das Tetrahydronaphthalin-1-ol **64** und als das Tetrahydronaphthalin-1-on **65** identifiziert werden. Die Reaktionsgleichung ist in **Abbildung 55** abgebildet.

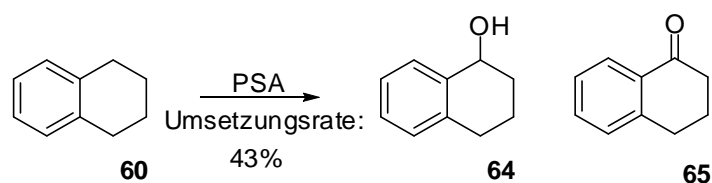


Abbildung 54: Biotransformation von Tetrahydronaphthalin 60 mit dem Lyophilisat des *P. sapidus*.

Der Vergleich der Biotransformation von 1,2-Dihydronaphthalin **59** mit der Biotransformation von Tetrahydronaphthalin **60** zeigt, dass die allylische Oxidation schneller und mit höheren Umsätzen erfolgt als die benzyllische Oxidation. Da das Lyophilisat ein Enzymgemisch ist, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass an der benzyllischen Oxidation ein anderes Enzym beteiligt ist als an der allylischen Oxidation.

Biotransformation von Diphenylmethan 61

Diphenylmethan **61** konnte zwar erfolgreich mit dem Lyophilisat von *P. sapidus* am benzyllischen C-Atom oxidiert werden, allerdings verlief die Biotransformation mit einer prozentualen Umsetzungsrate von lediglich 18%. Das GC-MS-Chromatogramm ist in **Abbildung 56** dargestellt.

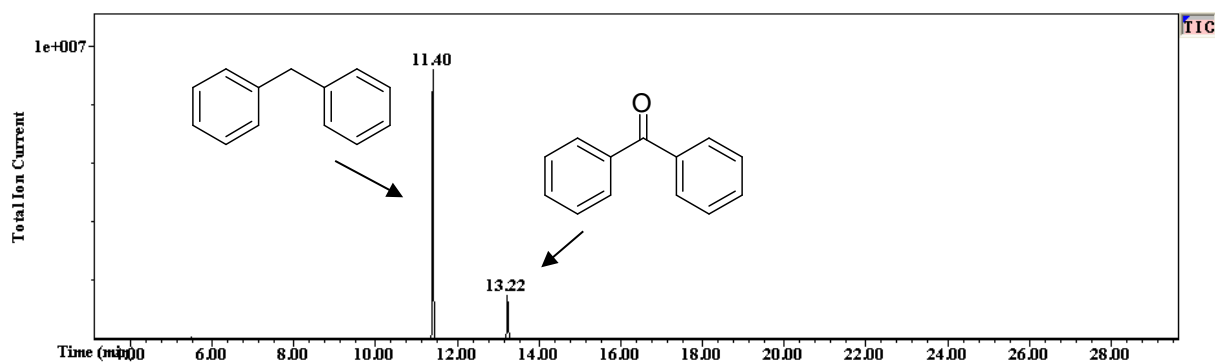


Abbildung 55: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von Diphenylmethan 61.

Bei der Biotransformation bildete sich ein Produkt, welches durch den Vergleich von Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten als das Benzophenon **66** identifiziert wurde (**Abbildung 57**).

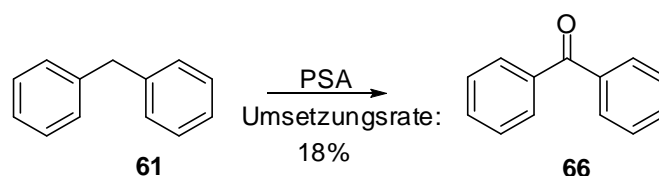


Abbildung 56: Biotransformation von Diphenylmethan **61 mit dem Lyophilisat des *P. sapidus*.**

Dieses Ergebnis stimmt im Wesentlichen mit dem Ergebnis der Biotransformation von Tetrahydronaphthalin **60** überein. Dabei kann man zusammenfassen, dass eine benzyliche Oxidation mit dem Lyophilisat von *P. sapidus* im Prinzip zwar möglich ist, die Reaktionsbedingungen aber in Hinsicht auf bessere Umsetzungsraten optimiert werden müssten. Da es eine berechtigte Vermutung gibt, dass die benzyliche Oxidation von einem anderen im Lyophilisat vorhandenen Enzym katalysiert wird als die allyliche Oxidation, könnte man bessere Umsetzungsraten erhalten, indem man die Reaktionsbedingungen wie zum Beispiel den pH-Wert, die Temperatur oder das verwendete Puffersystem an den optimalen Aktivitätsbereich dieses Enzymsystems anpassen würde.

Biotransformation von Heterocyclen

Heterocyclen sind ringförmige Verbindungen mit mindestens einem Heteroatom (meist N, O, oder S, aber auch z.B. Übergangsmetalle), welche in gesättigte, ungesättigte und aromatische Gruppen unterteilt werden können. Sie sind in der Natur weit verbreitet und bilden z.T. eigene Naturstoffklassen. Die Stoffklasse der Kohlenhydrate besteht zum Beispiel aus O-Heterocyclen und das Motiv der N-Heterocyclen findet sich in vielen Naturstoffen wie Alkaloiden, Porphyrinderivaten oder auch den Nukleobasen wieder (**Abbildung 58**).

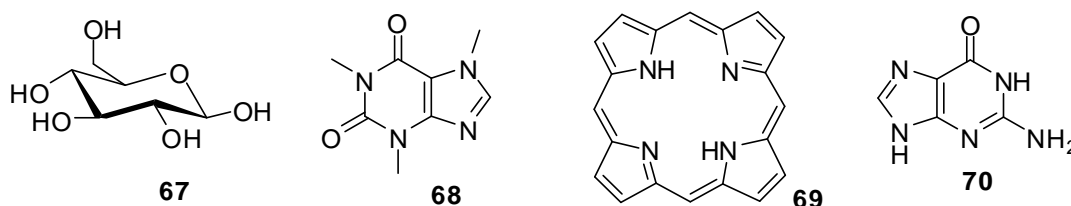


Abbildung 57: Bekannte Vertreter aus den Naturstoffklassen der Kohlenhydrate (D-Glucose 67), der Alkaloide (Coffein 68), der Porphyrinderivate (Porphyrin 69) und der Nukleobasen (Guanin 70).

Aufgrund der häufigen Verwendung von heterocyclischen Intermediaten in der organischen Synthese, insbesondere in der Naturstoffsynthese, bilden die Heterocyclen im Rahmen der Substratevaluierung eine besonders interessante Gruppe. Deswegen wurden einige ausgewählte N- und O-Heterocyclen mit dem Lyophilisat von *P. sapidus* biotransformiert.

O-Heterocyclen

Der allylische Spiroether Theaspiran **71** (**Abbildung 59**) und seine Derivate wurden erfolgreich von Verena Weidmann im Rahmen ihrer Masterarbeit²²⁵ und Doktorarbeit^{206,226} umgesetzt. Das Theaspiran **71** ist ein Spirocyclus, bei dem der Sauerstoff jedoch aufgrund der räumlichen Distanz keinen großen Einfluss auf die Bindungsdissoziationsenergie der allylischen CH-Bindung nehmen kann.

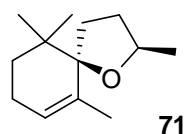


Abbildung 58: Heterocyclischer Bicyclus: Theaspiran 71.

Biotransformation von 3,4-Dihydro-2H-pyran **72** und 2-Methoxy-3,4-dihydro-2H-pyran **73**

Eine interessante Fragestellung ist, ob auch monocyclische Enoether, bei denen der Sauerstoff direkt neben der Doppelbindung liegt und somit einen starken Einfluss auf die Reaktivität der allylischen CH-Bindung nehmen kann, ebenfalls von dem Lyophilisat oxidiert werden können. Aus diesem Grund wurden zunächst das käuflich erhältliche 3,4-Dihydro-2H-pyran **72** und das 2-Methoxy-3,4-dihydro-2H-pyran **73** mit dem Lyophilisat umgesetzt. Das Ziel dieser Umsetzungen war eine Idee davon zu bekommen, ob die heterocyclischen Verbindungen aufgrund der veränderten elektronischen Eigenschaften überhaupt als Substrate für die Biotransformation eingesetzt werden können.

Wie man aus **Abbildung 60** entnehmen kann, wurden die Verbindungen **72** und **73** überhaupt nicht umgesetzt. Nach zahlreichen Versuchen konnten jeweils nur die Edukte reisoliert werden.

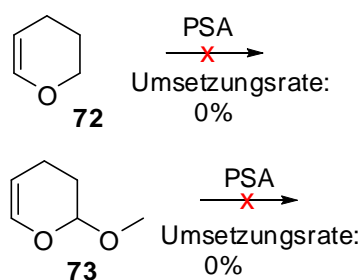


Abbildung 59: Biotransformation von 3,4-Dihydro-2H-pyran **72** und 2-Methoxy-3,4-dihydro-2H-pyran **73** mit dem Lyophilisat des *P. sapidus*. Es konnten keine Biotransformationsprodukte nachgewiesen werden.

Eine Erklärung dafür, dass die beiden Moleküle nicht biotransformiert werden konnten, hängt höchstwahrscheinlich mit der Stabilität der gebildeten Allylradikale zusammenhängen. Wie man am Beispiel des Dihydropyrans **72** sieht, wird das gebildete Allylradikal, im Gegensatz zum Allylradikal der Verbindung **74**, weniger stark durch Hyperkonjugation stabilisiert (**Abbildung 61**). Dadurch wird die Bindungsdissoziationsenergie der allylischen CH-Bindung im Falle des Dihydropyrans **72** erhöht. Um diese Theorie zu bestätigen, sollte im Folgenden eine Modellverbindung synthetisiert und biotransformiert werden.

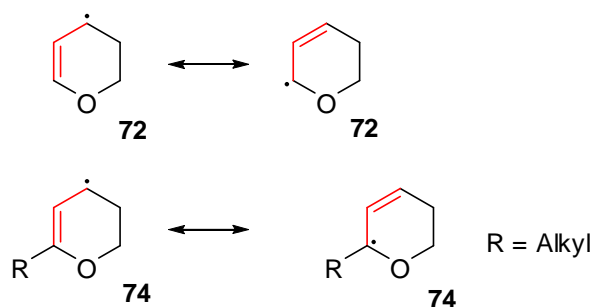


Abbildung 60: Das Allylradikal des 3,4-Dihydro-2H-pyran **72** wird weniger stark durch Hyperkonjugation stabilisiert als beim Molekül **74**. Das Molekül **74** besitzt eine Alkylfunktion in der Nähe zum Sauerstoff und ist somit in der Lage, ein stabileres Allylradikal zu bilden.

Synthese von 1-Propyl-3,4-dihydro-2H-pyran **75**

Als Modellverbindung zur Prüfung der oben aufgestellten Theorie zur Radikalstabilität wurde das Propyldihdropyran **75** verwendet. Dieses konnte erfolgreich in einem Schritt synthetisiert werden.

1-Propyl-3,4-dihydro-2H-pyran **75** konnte mit *sec*-BuLi, 1-Iodpropan in abs. THF bei - 78 °C aus 3,4-Dihydro-2H-pyran **72** synthetisiert werden (**Abbildung 62**).²²⁷ Dabei musste genau auf die Temperatur geachtet werden, denn diese durfte während der gesamten Reaktionsdauer nicht mehr als - 78 °C betragen. Bei minimal höheren Temperaturen bildete sich ein Produktgemisch von mindestens sechs Nebenprodukten, welche mittels GC-MS nachgewiesen, jedoch nicht identifiziert werden konnten. Bei einer Temperatur von - 78 °C wurde hingegen nur ein Produkt mit einer Ausbeute von 94% erhalten. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer GC gereinigt. Die Gesamtausbeute betrug nach der Reinigung 81%.

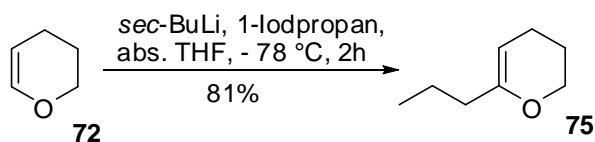


Abbildung 61: Synthese von 1-Propyl-3,4-dihydro-2H-pyran **75**.

In den gängigen NMR-Lösungsmitteln wie CDCl_3 oder DMSO zersetzen sich die DHP-Derivate sehr rasch, weshalb bei der NMR Probenvorbereitung Aceton- d_6 verwendet wurde.

Biotransformation von 1-Propyl-3,4-dihydro-2H-pyran **75**

Das reine 1-Propyl-3,4-dihydro-2H-pyran **75** wurde anschließend mit dem Lyophilisat von *P. sapidus* biotransformiert. Die Versuche, das Rohprodukt säulenchromatographisch und über die präparative GC zu reinigen scheiterten, da hierbei das zuvor bereits nachgewiesene Produkt wieder zum entsprechenden Edukt zurückreagierte. Weiterhin zeigte das GC-FID-Chromatogramm (**Abbildung 63**) bei einer weiteren Umsetzung, dass das Edukt annähernd vollständig zu einem einzigen Produkt umgesetzt wurde.

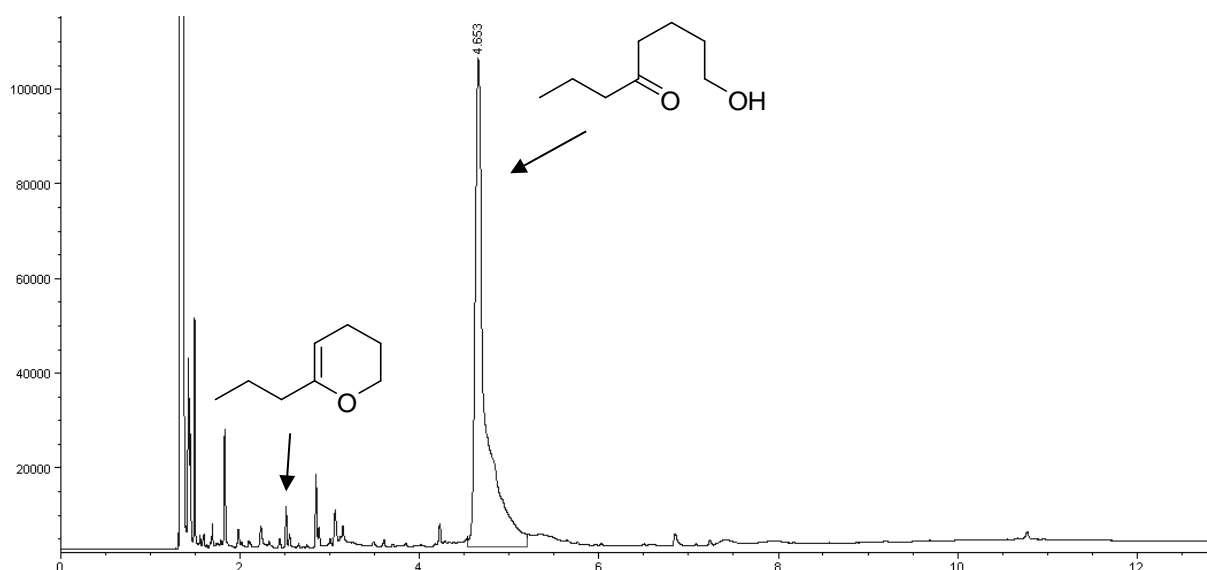


Abbildung 62: GC-FID-Chromatogramm der Biotransformation von 1-Propyl-3,4-dihydro-2H-pyran **75**.

Aus diesen Gründen wurde im Folgenden auf eine Reinigung verzichtet. So konnte das Produkt mittels NMR- und HRMS-Analytik als 1-Hydroxyoctan-5-on **76**, mit einer Ausbeute von 33% identifiziert werden (**Abbildung 64**).

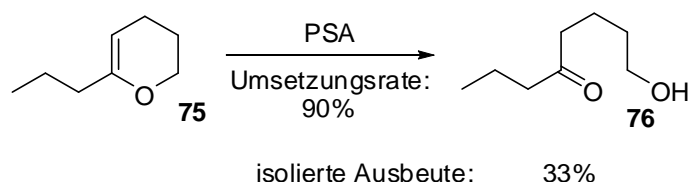


Abbildung 63: Biotransformation von 1-Propyl-3,4-dihydro-2H-pyran **75**.

Um sicher zu gehen, dass die enzymatische Aktivität des Lyophilisats für die Reaktion verantwortlich war, wurde das Substrat mit thermisch inaktiviertem Lyophilisat (100 °C, 2 h) in Tris-HCl-Puffer bei RT

gerührt. Doch auch hier konnte nach einer Reaktionsdauer von 24 h die Bildung von 1-Hydroxyoctan-5-on **76** beobachtet werden (**Abbildung 65**).

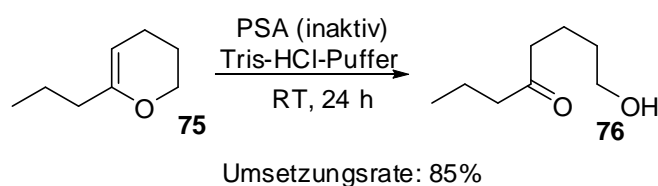


Abbildung 64: Das Ergebnis des Kontrolleperiments zeigte, dass sich auch bei der Verwendung von thermisch inaktivem Lyophilisat das 1-Hydroxyoctan-5-on **76** gebildet hatte.

Dieses Ergebnis lässt den Schluss auf eine säurekatalysierte elektrophile Addition von Wasser an die Doppelbindung des Enolethers mit einer anschließenden säurekatalysierten Spaltung des so gebildeten Halbacetals **78** zu (**Abbildung 66**).

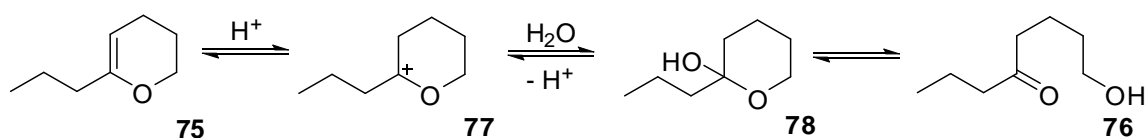


Abbildung 65: Säurekatalysierte elektrophile Addition von Wasser an 1-Propyl-3,4-dihydro-2H-pyran **75** im wässrigen Tris-HCl-Puffer und anschließende Spaltung des Halbacetals **78**.

Durch dieses Experiment hat sich herauskristallisiert, dass Moleküle vom Typ des 1-Propyl-3,4-dihydro-2H-pyran **75** aufgrund ihrer Instabilität in wässrigen Systemen keine geeigneten Substrate für die zu untersuchende Biotransformation darstellen. Da das Molekül im wässrigen Medium und unter Hitzeeinwirkung sehr schnell hydrolysiert, hat das Lyophilisat keine Möglichkeit, es zu oxidieren.

N-Heterocyclen

Aufgrund der bereits erwähnten Bedeutung von N-Heterocyclen in der Naturstoffsynthese wurden zunächst zwei ausgewählte und käuflich erhältliche Verbindungen mit dem Lyophilisat von *P. sapidus* biotransformiert. Dabei handelte es sich um die Verbindungen *N*-Boc-4,5-Dihydropyridin **79** und *N*-Boc-5,6-Dihydropyridin **80** (**Abbildung 67**). Beide Substrate sind Boc-geschützt und unterscheiden sich lediglich in der Position der Doppelbindung.

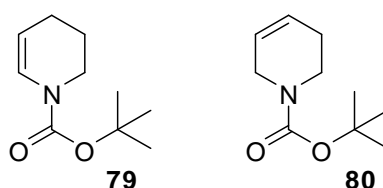


Abbildung 66: Boc-geschützte N-Heterocyclen: *N*-Boc-4,5-Dihydropyridin **79** und *N*-Boc-5,6-Dihydropyridin **80**.

Biotransformation von *N*-Boc-4,5-Dihydropyridin **79**

Die Biotransformation des Enamins **79** war nach drei Tagen abgeschlossen. Dabei bildete sich vor allem ein Hauptprodukt und die prozentuale Umsetzungsrate betrug 88%. Das GC-MS-Chromatogramm ist in **Abbildung 68** dargestellt.

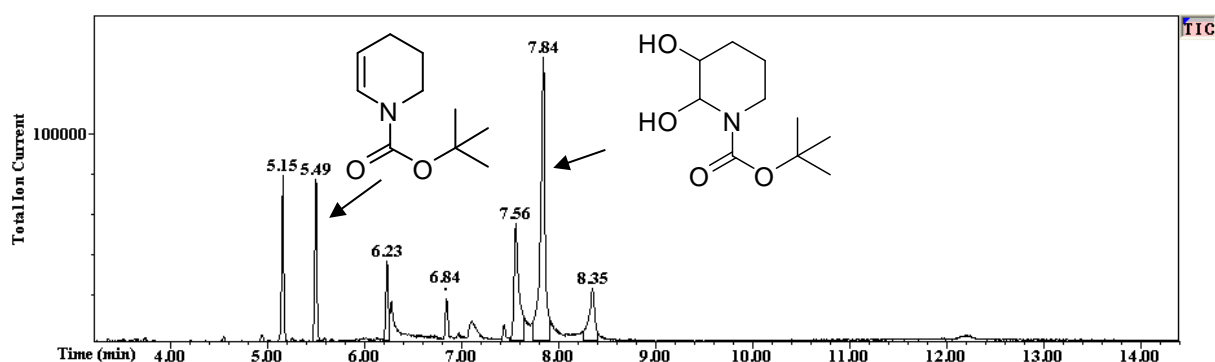


Abbildung 67: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von *N*-Boc-4,5-Dihydropyridin **79**.

Das Rohprodukt konnte säulenchromatographisch gereinigt werden, wobei das Diol **81** mit einer Ausbeute von 26% erhalten wurde (**Abbildung 69**). Bei der säulenchromatographischen Reinigung konnte zusätzlich ein Nebenprodukt isoliert werden, welches als der Alkohol **82** identifiziert werden

konnte. Dieses konnte jedoch nur in Spuren erhalten werden und die aufgenommenen NMR-Spektren zeigten Signale von Verunreinigungen.

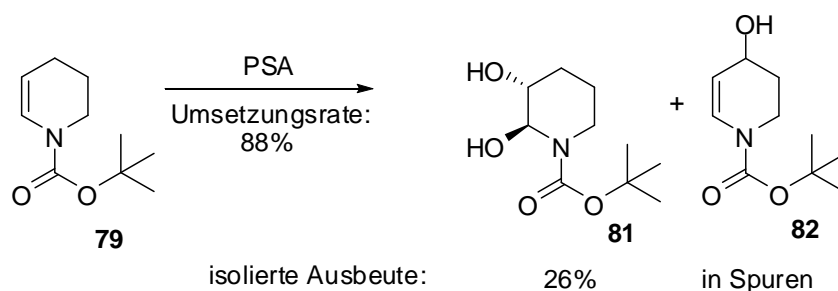


Abbildung 68: Biotransformation von *N*-Boc-4,5-Dihydropyridin 79 mit dem Lyophilisat des *P. sapidus*.

Die Strukturaufklärung der Hauptfraktion gestaltete sich schwierig. Die NMR-Spektren deuteten zunächst auf ein Epoxid hin, denn im ^1H -Spektrum waren keine Protonen von Hydroxygruppen erkennbar. Die GCMS-Spektren konnten nicht zur Strukturaufklärung beitragen, da der Moleküllionenpeak nicht sichtbar war. Die röntgendiffraktometrischen Aufnahmen der sich im NMR-Röhrchen gebildeten hellgelben Kristalle zeigten jedoch deutlich, dass es sich um das *trans*-Diol **81** handeln muss (**Abbildung 70**). Auch die HRMS-Messung konnte dieses Ergebnis bestätigen.

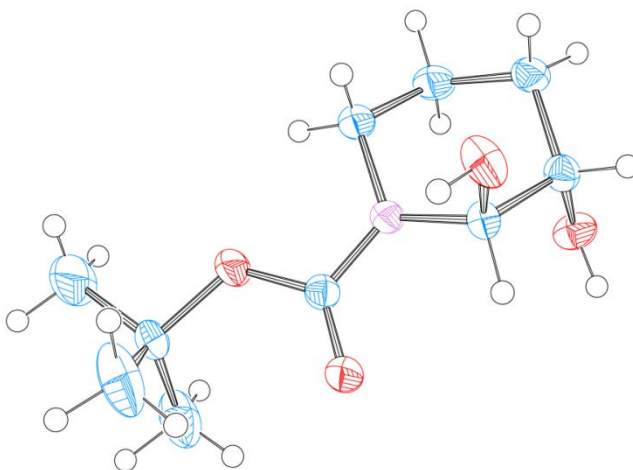


Abbildung 69: Kristallstruktur von *N*-Boc-2,3-Dihydroxypiperidin 81.

Die durchgeführten Kontrollexperimente konnten zusätzlich bestätigen, dass das gebildete Produkt aufgrund der enzymatischen Aktivität des Lyophilisats entstanden war. Welches Enzymsystem an der Oxidation beteiligt war, müsste jedoch weiter untersucht werden.

Erwähnenswert ist noch die Tatsache, dass die zwei Kohlenstoffe in der Nachbarschaft zum Stickstoffatom keine Signale im ^{13}C -Spektrum lieferten bzw. diese Signale nicht sichtbar waren. Lediglich die Korrelation mit den entsprechenden Protonen im HSQC deutet auf deren Existenz hin.

Das erhaltene *trans*-Diol **81** ist eine interessante Verbindung für die Naturstoffsynthese und wird zum Beispiel als ein Intermediat in der Totalsynthese von (-)-Actinophyllsäure verwendet, welches eine spannende Rolle bei der Erforschung von thrombotischen Erkrankungen spielt.²²⁸

Biotransformation von *N*-Boc-5,6-Dihydropyridin **80**

Die Biotransformation von *N*-Boc-5,6-Dihydropyridin **80** dauerte drei Tage. Die prozentuale Umsetzungsrate betrug 90% und im GC-MS-Spektrum sind deutlich zwei Hauptprodukte zu erkennen (Abbildung 71).

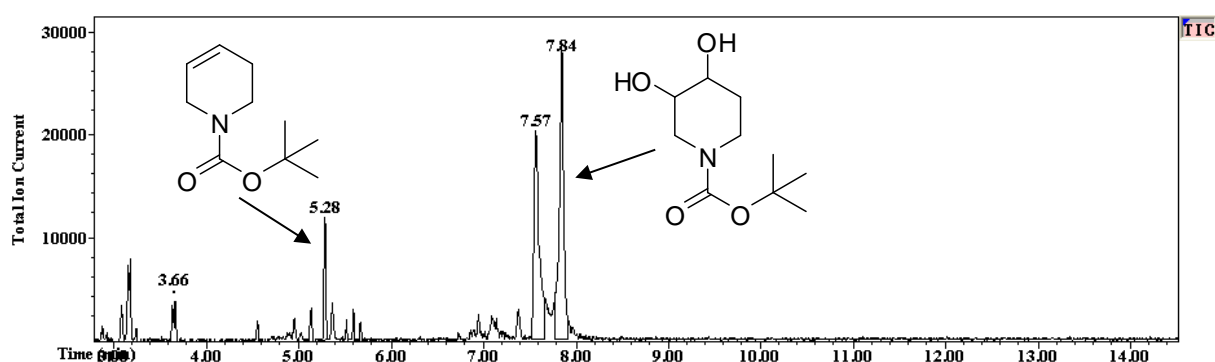


Abbildung 70: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von *N*-Boc-5,6-Dihydropyridin **80**.

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt, wobei nur eine Fraktion mit einer Ausbeute von 21% erhalten wurde. Die erhaltene Substanz konnte als das Diol **83** identifiziert werden (Abbildung 72). Das zweite Hauptprodukt konnte weder bei der säulenchromatographischen Reinigung noch bei der gaschromatographischen Reinigung von den Nebenprodukten abgetrennt und identifiziert werden.

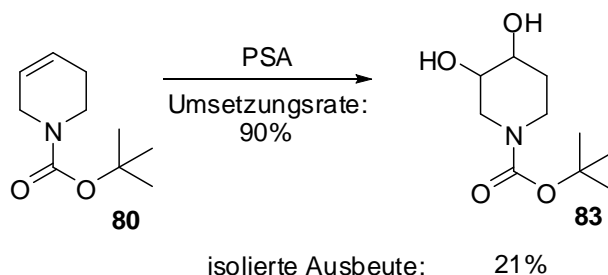


Abbildung 71: Biotransformation von *N*-Boc-5,6-Dihydropyridin **80** mit dem Lyophilisat des *P. sapidus*.

Ähnlich wie im Fall des *N*-Boc-4,5-Dihydropyridins **79** zeigten die Protonen der Hydroxygruppen im ^1H -Spektrum keine erkennbaren Signale. Die Bestätigung der Diol-Struktur **83** mittels Kristallstrukturanalyse war nicht möglich, da verschiedene Versuche, das Diol **83** zu kristallisieren nicht erfolgreich waren. Allerdings konnte das Molekül durch den Vergleich der NMR-Spektren mit den Literaturdaten²²⁹ und mittels der HRMS-Messung eindeutig identifiziert werden.

Synthese von 1,2,3,4-Tetrahydropyridin **84** und 1,2,3,6-Tetrahydropyridin **85**

Es hat sich gezeigt, dass die Boc-geschützten N-Heterocyclen **79** und **80** durch das Lyophilisat von *P. sapidus* umgesetzt werden konnten. Als nächstes sollten die entschützten Tetrahydropyridine **84** und **85** mit dem Lyophilisat umgesetzt werden. Da sich die elektronischen Eigenschaften am Stickstoffatom nach dem Entfernen der Schutzgruppe ändern, könnten dadurch neue Erkenntnisse bezüglich der Substratspezifität gewonnen werden.

Die Entfernung der Boc-Schutzgruppe erfolgte mit TFA in CH_2Cl_2 . Das Boc-geschützte Substrat wurde dazu mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (3 mL, v/v 4:1) versetzt und bei 25 °C für 24 h gerührt (**Abbildung 73**). Eine Reinigung und Bestimmung der Ausbeute war bei diesen Produkten nicht möglich. Es konnte keine NMR-Analytik durchgeführt werden, da die Produkte in den gängigen NMR-Lösungsmitteln nicht stabil waren. Die GC-MS Spektren zeigten zwar die Bildung eines Produktes, jedoch neigen diese Verbindungen stark dazu, polymerartige Nebenprodukte auszubilden, welche im GC-MS nicht erkennbar sind.

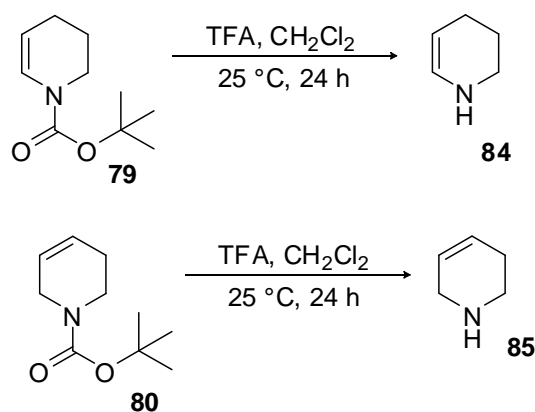


Abbildung 72: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure in CH_2Cl_2 .

Die Biotransformation der Rohprodukte **84** und **85** zeigte, dass diese Verbindungen, ähnlich wie bei den O-Heterocyclen, nicht von dem Lyophilisat umgesetzt wurden.

Biotransformation von acyclischen Verbindungen

Die Biotransformation von Substraten mit verschiedenen Ringgrößen, unterschiedlichen Substituenten und Heteroatomen hat gezeigt, dass Moleküle mit einem starren Cyclohexengrundgerüst bevorzugt von dem Lyophilisat des *P. sapidus* umgesetzt werden. Dieses Ergebnis deutet auf eine gewisse Substratspezifität des zu untersuchenden Biokatalysators hin. Um dies zu bestätigen, sollten auch acyclische Verbindungen mit dem Lyophilisat biotransformiert werden. Für die ersten Versuche wurden zwei käuflich erhältliche Moleküle ausgewählt. Das terpenoide Citronellal **86** und das *trans*-Decen **88**.

Biotransformation von Citronellal **86**

Citronellal **86** ist ein Monoterpen-Aldehyd und kommt hauptsächlich in Zitruspflanzen und Citronenöl vor.^{230,231} In Bezug auf die Substratevaluierung ist Citronellal **86** eine interessante Verbindung, denn mit seiner offenkettigen Struktur und der Aldehydfunktion gewährt es neue Erkenntnisse zur Substratspezifität des Biokatalysators. Da gezeigt werden konnte, dass Terpene tendenziell leichter umgesetzt werden, besteht eine große Wahrscheinlichkeit, dass das Citronellal **86** trotz seiner acyclischen Struktur umgesetzt werden kann.

Die Biotransformation von Citronellal **86** erfolgte schnell und das eingesetzte Edukt wurde mit einer Umsetzungsrate von 93% fast vollständig umgesetzt, wobei hauptsächlich ein Produkt entstand. Das GC-MS-Chromatogramm ist in **Abbildung 76** dargestellt.

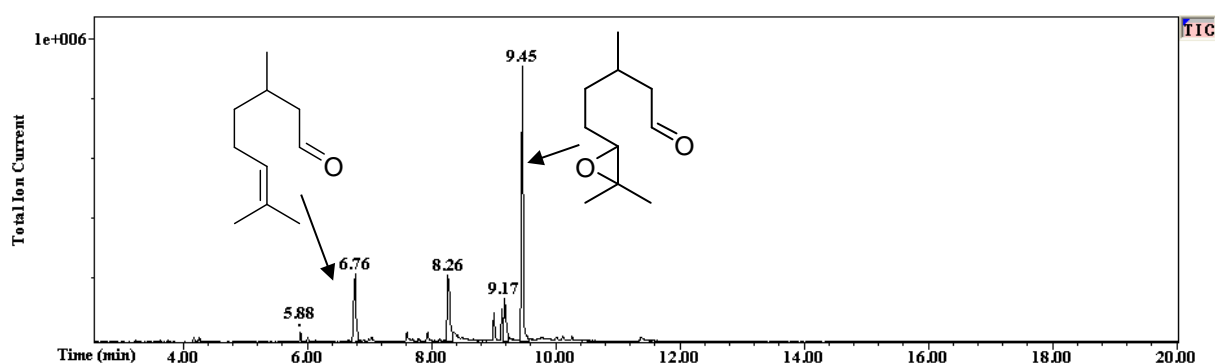


Abbildung 73: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von Citronellal **86**.

Das Hauptprodukt konnte nach der säulenchromatographischen Reinigung mittels NMR-Analytik als das Epoxid **87** identifiziert werden (**Abbildung 77**). Die Ausbeute betrug Ausbeute 29%

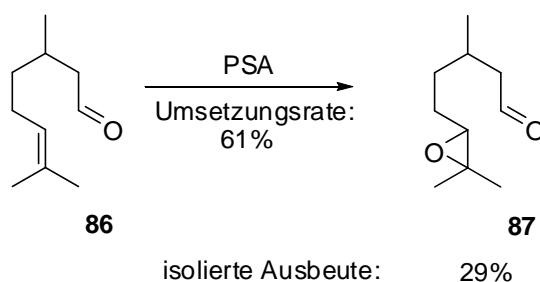


Abbildung 74: Biotransformation von Citronellal **86 mit dem Lyophilisat des *P. sapidus***

Durch die Erfahrungswerte mit dem zuvor untersuchten β -Cyclocitral **32** erschien die Bildung des Epoxids als ungewöhnlich. Die Aldehydfunktion des β -Cyclocitrals **32** wurde zu einer Carbonsäure oxidiert und ein entsprechendes Ergebnis wurde auch für das Citronellal **86** erwartet. Die NMR-Analytik konnte aber zweifelsfrei bestätigen, dass es sich um das Epoxid **87** handeln muss.

Biotransformation von *trans*-Dec-5-en **88**

Als ein einfaches acyclisches Substrat wurde *trans*-Dec-5-en **88** ausgewählt. Es ist käuflich erhältlich und wurde aufgrund seiner, den Monoterpenen ähnlichen, Molekülmasse ausgewählt. Bei der Biotransformation stellte sich jedoch heraus, dass *trans*-Dec-5-en **88** nicht oxidiert werden konnte (**Abbildung 78**). Die Reaktion wurde nach 7 Tagen abgebrochen. Auch nach dieser langen Zeit konnte nur das Edukt isoliert und nachgewiesen werden.

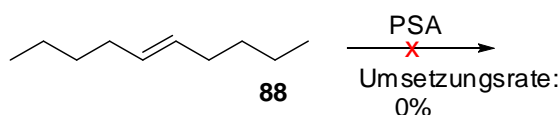


Abbildung 75: Biotransformation von *trans*-Dec-5-en **88 mit dem Lyophilisat des *P. sapidus*.**

Es wurde vermutet, dass das negative Ergebnis der Biotransformation von *trans*-Dec-5-en **88** möglicherweise mit der Konfiguration seiner Doppelbindung zusammen hängen könnte. Offenkundig ähnelt eine Verbindung mit *cis*-Konfiguration geometrisch eher einer cyclischen Verbindung als *trans*-Isomer. Aus diesem Grund wurde entschieden *cis*-Dec-5-en **92** zu synthetisieren und mit dem Lyophilisat von *P. sapidus* umzusetzen, um einen direkten Vergleich der beiden Isomere zu gewährleisten.

Synthese von *cis*-Dec-5-en **92**

Da *cis*-Dec-5-en **92** nicht käuflich erhältlich ist, wurde es erfolgreich in zwei Schritten mit Hilfe der Wittig Reaktion synthetisiert. **Abbildung 79** zeigt die Syntheseroute zur Darstellung von *cis*-Dec-5-en **92**.

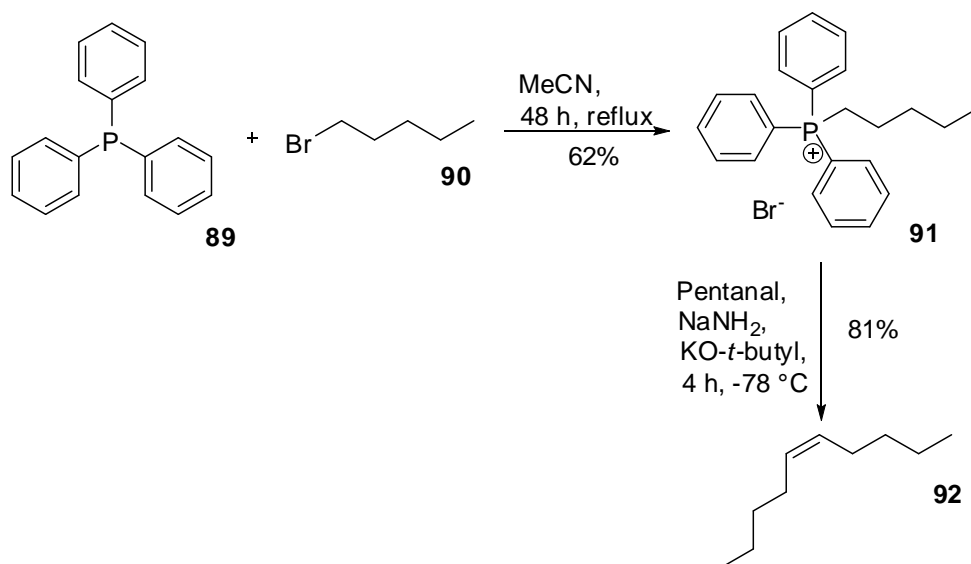


Abbildung 76: Syntheseroute zur Darstellung von *cis*-Dec-5-en **92**.

Die Synthese von Pentyltriphenylphosphoniumbromid **91** erfolgte aus Triphenylphosphin **89** mit 1-Brompentan **90** in MeCN. Das Reaktionsgemisch wurde 48 h unter Rückfluss erhitzt. Nach der Aufarbeitung mit Toluol konnte das Produkt **91** mit einer Ausbeute von 62% erhalten werden. Aufgrund seiner guten Reinheit konnte das Produkt **91** ohne weitere Reinigungsoperationen im nächsten Syntheseschritt verwendet werden.

Die Wittig-Reaktion erlaubt die Synthese von Alkenen durch Reaktion von Aldehyden oder Ketonen mit Yliden. Die stereoselektive Wittig-Olefinierung wurde nach Hamatani *et al.* durchgeführt.²³² Das Ylid wurde *in situ* durch Deprotonierung des Pentyltriphenylphosphoniumbromids **91** mit einer geeigneten Base, in diesem Fall mit NaNH₂ und KO*t*Bu, generiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf -78 °C gekühlt, mit Pentanal versetzt und für weitere 2 h gerührt. Das *cis*-Dec-5-en **92** konnte auf diese Weise mit einer Ausbeute von 81% erhalten werden.

Biotransformation von *cis*-Dec-5-en **92**

Die Biotransformation von *cis*-Dec-5-en **92** verlief ähnlich wie im Fall von *trans*-Dec-5-en **88**. Bei der Aufarbeitung konnte auch hier nur das eingesetzte Edukt isoliert werden (**Abbildung 80**).

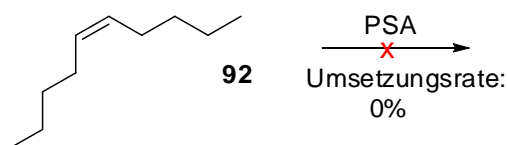


Abbildung 77: Biotransformation von *cis*-Dec-5-en **92** mit dem Lyophilisat des *P. sapidus*.

Mit diesem Ergebnis wurde bestätigt, dass die unverzweigten Alkene durch das Lyophilisat nicht umgesetzt werden können und dass die *cis-trans*-Isomerie der Doppelbindung offenbar keine alleinige Rolle für die Umsetzung spielt. Das Ergebnis untermauert auch die bereits in einem früheren Kapitel erläuterte Hypothese, dass der Reaktionsmechanismus dem einer Radikalreaktion ähnelt. Durch die fehlende Alkylgruppe an der Doppelbindung wird das Allylradikal weniger stark stabilisiert.

Biotransformation von 2,3-Dimethylpent-2-en **93**

Um den Einfluss der Verzweigung auf die Oxidation acyclischer Substrate weiter zu untersuchen, wurde das Molekül 2,3-Dimethylpent-2-en **93** ausgewählt. Durch seine verzweigte Struktur mit den beiden Alkylgruppen an der Doppelbindung besitzt dieses Substrat die erforderliche Struktur, um ein stärker stabilisiertes Allylradikal bilden zu können.

Die Biotransformation von 2,3-Dimethylpent-2-en **93** erfolgte schnell und das eingesetzte Edukt wurde mit einer Umsetzungsrate von 97% fast vollständig umgesetzt. Dabei entstand hauptsächlich ein Produkt, welches im GC-MS-Chromatogramm in der **Abbildung 81** zu erkennen ist.

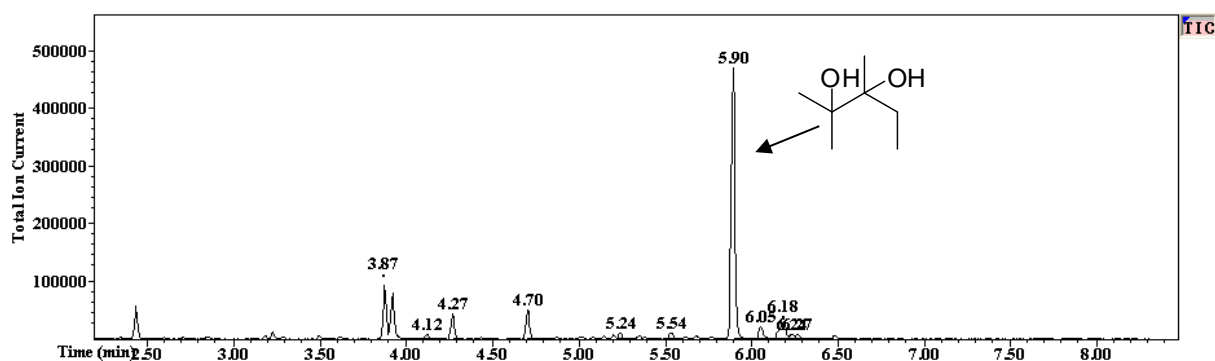


Abbildung 78: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von 2,3-Dimethylpent-2-en **93**.

Das Hauptprodukt konnte nach der säulenchromatographischen Reinigung mittels NMR-Analytik als das Diol **94** identifiziert werden (Abbildung 82). Die Ausbeute lag bei 27%.

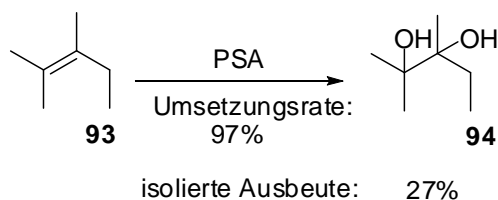


Abbildung 79: Biotransformation von 2,3-Dimethylpent-2-en **93** mit dem Lyophilisat des *P. sapidus*.

Das anschließende Kontrollexperiment zeigte allerdings, dass auch mit einer hohen Menge an H_2O_2 (30%, 3 Äq.), ohne jegliche Zusätze an Biomasse, eine Umsetzung zum Diol **94** stattfand. Daraus lässt sich schließen, dass keine enzymatische Katalyse sondern eine Autokatalyse stattgefunden haben muss. Möglicherweise diene das im Lyophilisat in geringen Mengen vorhandene H_2O_2 als Oxidationsmittel.

Biotransformation von Linolsäuremethylester **96** und Myrcen **95**

In diesem Abschnitt soll kurz auf die Biotransformationen des Linolsäuremethylesters **96** und des Monoterpens Myrcen **95** eingegangen werden. Diese beiden offenkettigen Moleküle sind natürlichen Ursprungs. Nach vielfältigen Versuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Moleküle durch das Lyophilisat von *P. sapidus* nicht zu den gewünschten Oxidationsprodukten umgesetzt werden konnten (**Abbildung 83**).

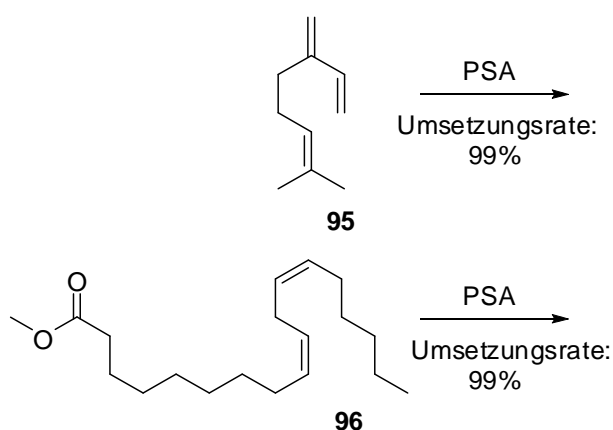


Abbildung 80 Biotransformation von Myrcen **95** und Linolsäuremethylester **96** mit dem Lyophilisat des *P. sapidus*.

Bei der Biotransformation von Myrcen **95** konnte man im GC-MS-Spektrum nur mehrere nicht identifizierbare Fragmente erkennen, welche eine geringere molekulare Masse als Myrcen **95** selbst aufwiesen. Das Edukt war demzufolge fast vollständig zersetzt worden.

Plagemann *et al.* gelang bereits die Oxidation der Linolsäure mit einer rekombinanten Lipxygenase aus *P. sapidus*.²³³ Als Oxidationsprodukte konnten dabei Hydroperoxide erhalten werden. Eine Anzahl an Studien konnte beweisen, dass viele Lipxygenasen auch in der Lage sind, veresterte Fettsäuresubstrate zu oxidieren.²³⁴ Aus diesem Grund wurde der Linolsäuremethylester **96** ausgewählt, um mit dem Lyophilisat des Basidiomyceten biotransformiert zu werden. Ein Vorteil bei der Verwendung des Esters anstelle der Säure selbst bestand außerdem in der einfacheren gaschromatographischen Analyse. Doch auch bei der Biotransformation des Methylesters **96** wurde schon nach einer Reaktionsdauer von 1 h das gleiche Ergebnis wie bei Myrcen **95** beobachtet, nämlich eine fast vollständige Zersetzung des Substrates.

Da das Lyophilisat ein Enzymgemisch darstellt, enthält es eine Vielfalt an bindungsspaltenden Enzymen, welche möglicherweise für die Zersetzung der beiden Verbindungen **95** und **96** verantwortlich sein könnten. Dies ist vor allem bei dem Linolsäuremethylester **96** denkbar, da die

Fettsäuren und deren Ester auch sonst bei den Pilzen als eine natürliche C-Quelle Verwendung finden.

Biotransformation von Polyöl 110

Jedes Jahr werden über 30 Mio. Tonnen von synthetischen Polymeren produziert.²³⁵ Klassische Polymere wie zum Beispiel das Polyethylen (PE) oder das Polypropylen (PP) finden sich in zahlreichen Anwendungen unseres täglichen Lebens.²³⁶ Um das Anwendungspotential der Polymere zu vergrößern, ist die Funktionalisierung ungesättigter Polymere das Mittel der Wahl.²³⁷ Dadurch werden die Einführung und der Austausch verschiedener funktioneller Gruppen ermöglicht.

Das Polyöl 110 ist ein nicht-funktionalisiertes, flüssiges Polybutadien mit einem hohen Anteil an *cis*-Doppelbindungen (**Abbildung 84**).^{iv} Es kann mittels Polymerisation aus 1,3-Butadien hergestellt werden und findet als hochreaktives, vernetzendes Bindemittel in Kleb- und Dichtmassen, Korrosionsschutzfarben, Imprägnierungen, Harzmodifizierungen und Kautschukmischungen Verwendung.

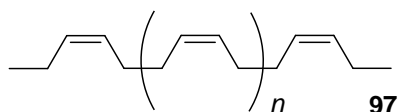


Abbildung 81: Ausschnitt aus einer Polymerkette von *cis*-1,4-Polybutadien 97.

Da das Lyophilisat des *Pleurotus sapidus* in der Lage ist, allylische Oxidationen zu katalysieren, sollte geprüft werden, ob Polyöl 110 ebenfalls an einer allylischen Position oxidiert werden kann. Durch die Einführung von OH- oder Carbonyl-Gruppen in das Molekül könnten weitere Modifikation an dem Polymer zugänglich gemacht werden.

Die Biotransformation des Polyöls 110 erfolgte nach der Standardmethode und dauerte 3 Tage. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels der NMR-, IR-, DC- und MALDI-Analytik untersucht. Die NMR-Spektren zeigten im Vergleich zum Edukt keine Veränderungen. Dies kann jedoch mit der hohen Molekülmasse der Verbindung zusammen hängen. Das IR-Spektrum des Biotransformationsprodukts zeigt hingegen eine deutliche, charakteristische Bande bei 1710.2 cm^{-1} (**Abbildung 85**). Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass das Polymer neugebildete Carbonyl-Verbindungen enthält.

^{iv} Quelle: Evonik Industries / corporate.evonik.de

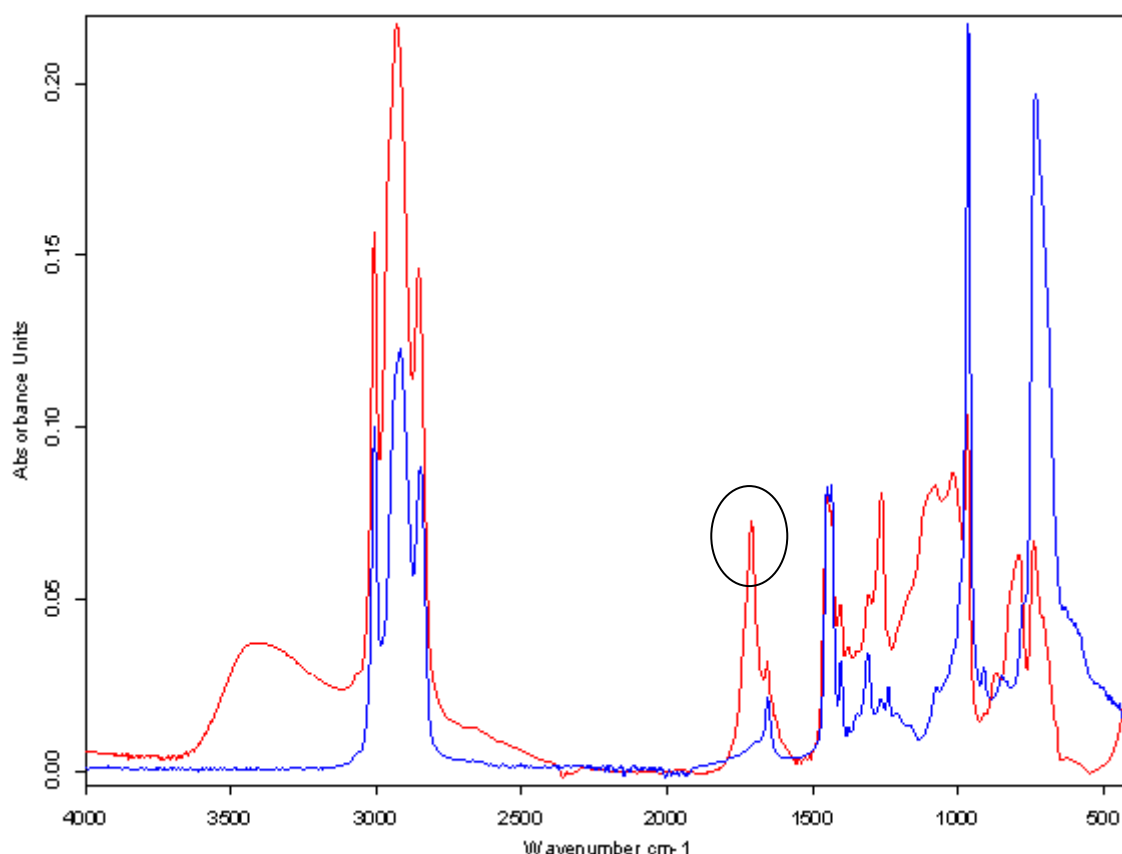


Abbildung 82: Zwei übereinander gelegte IR-Spektren. Blau: IR-Spektrum von Polyöl (ATR). Rot: IR-Spektrum des Biotransformationsprodukts von Polyöl (Film). Die markierte Bande liegt bei 1710.2 cm^{-1} .

In den letzten Jahren erreichte die MALDI-TOF-Massenspektrometrie einen bedeutenden Stellenwert als Routineanalytik zur Strukturcharakterisierung von synthetischen Polymeren.²³⁸ Unpolare Polymere wie zum Beispiel das Polybutadien **97** sind zwar schwieriger zu ionisieren, eine Ionisierung gelingt aber dennoch, indem Silber-, Kupfer- oder andere Kationen-Addukte der unpolaren Moleküle erzeugt werden.^{239,240} Auch das biotransformierte Polyöl 110 wurde mittels MALDI-TOF-MS analysiert, wobei ein AgNO_3 -Salz zur Matrix (DHB) hinzugefügt wurde. **Abbildung 86, a** zeigt das Maldi-TOF-Massenspektrum von dem reinen Polyöl 110. Man erkennt, dass die mittlere Molekulargewichtsverteilung etwa bei m/z : 580.09 liegt und auch große Moleküle mit einer Masse über m/z : 1500 vorhanden sind. **Abbildung 86, b** zeigt das Maldi-TOF-Massenspektrum nach der Biotransformation. Die Molekulargewichtsverteilung verschiebt sich deutlich in Richtung kleinerer Molekülmassen. Dies deutet darauf, dass offensichtlich bei der Biotransformation Bindungen gespalten wurden.

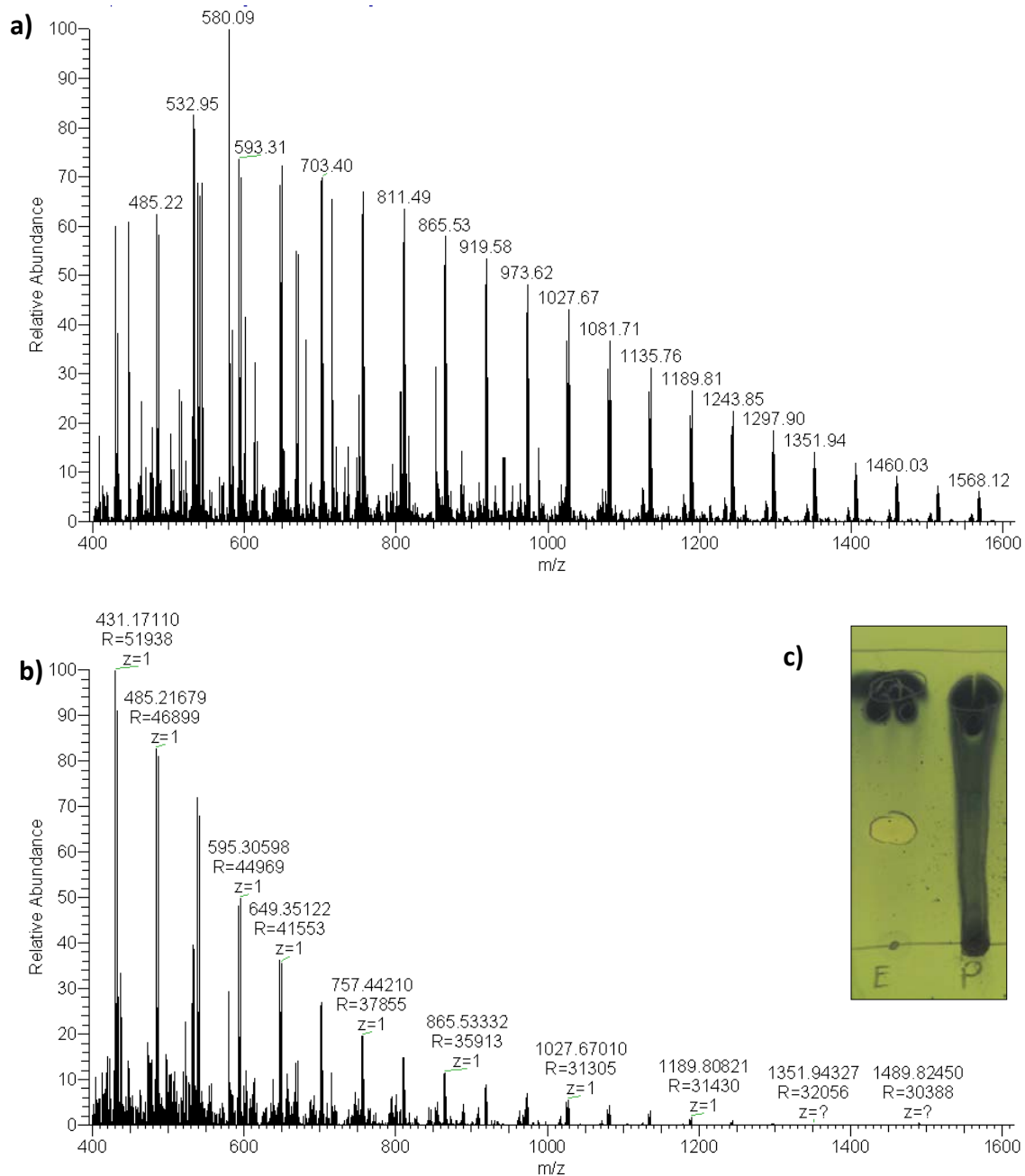


Abbildung 83: a) MALDI-TOF-Massenspektrum des Polyöls 110. b) MALDI-TOF-Massenspektrum des biotransformierten Polyöls 110. c) DC-Abbildung von E (Edukt: Polyöl 110) und P (Produkt: biotransformiertes Polyöl 110).

Auch eine dünnschichtchromatographische Untersuchung belegte eine Reaktion am Polymer. Wie **Abbildung 86, c** zu entnehmen ist, bildete das unpolare Polyöl nahezu keine Schlieren auf dem Trägermaterial. Nach der Biotransformation war eine deutliche Schlierenbildung zu erkennen, was ein Hinweis auf polare Gruppen sein kann, welche stärker mit der stationären Phase interagieren.

Als Fazit kann festgehalten werden, dass Polyöl 110 durch Lyophilisate von *P. sapidus* umgesetzt wurde. Mittels MALDI-Analytik wurde gezeigt, dass dabei eher kürzere Fragmente entstanden.

Anhand der IR-Spektren und der DC-Analytik ergaben sich zusätzliche Hinweise auf eine Oxidation. Allerdings wurde das Polymer möglicherweise an nur wenigen allylischen Positionen oxidiert. Dies könnte das Fehlen der Carbonylsignale im NMR-Spektrum erklären.

Anwendungsmöglichkeiten in der organischen Synthese

Naturstoffe spielen eine übergeordnete Rolle in der Entwicklung von Wirkstoffen. Ungefähr zwei Drittel aller Wirkstoffe in Form von kleinen Molekülen, welche zwischen 1981 und 2010 auf dem Markt erschienen, haben einen Naturstoff als Ursprung.²⁴¹ Gerade in Bezug auf die Tatsache, dass viele Naturstoffe im pharmazeutischen oder lebensmitteltechnischen Bereich eingesetzt werden, ist es äußerst wichtig, dass die Syntheseprodukte nach der Aufarbeitung keine toxischen oder kanzerogenen Verunreinigungen mehr enthalten. Das Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* ist in diesem Zusammenhang ein ungiftiger und umweltschonender Biokatalysator. In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, dass dieser erfolgreich in mehrstufigen organischen Synthesen eingesetzt werden kann.

Synthese und Biotransformation von Neroloxid **101**^v

Neroloxid **101** zählt wie Rosenoxid zu den Monoterpenen. Beide sind natürliche Bestandteile vieler aromatischer Pflanzen und sind für ihren frischen und anregenden Geruch bekannt.²⁴² Neroloxid **101** wurde erstmals aus der Bulgarischen Rose isoliert aber auch in einigen *Pelargonium* Arten und verschiedenen Traubenarten konnte es ausfindig gemacht werden. Heutzutage ist Neroloxid **101** eine wertvolle Basissubstanz für die Parfümindustrie und es ist in manchen Weinen für einen einzigartigen Geschmack verantwortlich.²⁴³

Neroloxid **101** ist aufgrund seiner Struktur und seiner olfaktorischen Eigenschaften ein attraktives Substrat für die allylische Oxidation mit dem Lyophilisat des Basidiomyceten *P. sapidus*. Da es nicht käuflich erhältlich ist, wurde es ausgehend von Nerol **98** in drei Schritten synthetisiert. Die **Abbildung 87** zeigt die Syntheseroute zur Darstellung von Neroloxid **101**.²⁴²

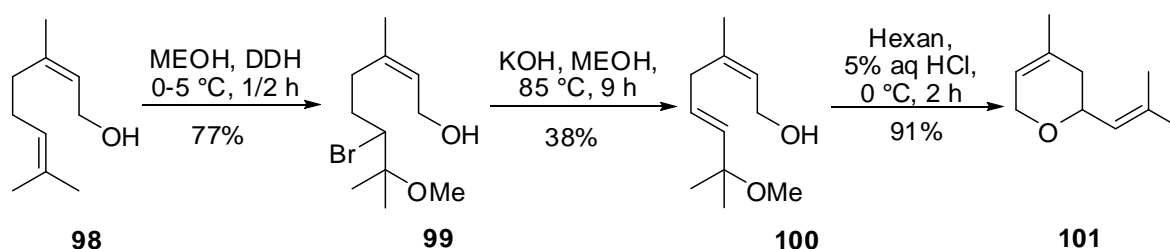


Abbildung 84: Syntheseroute zur Darstellung von Neroloxid **101**.²⁴²

^vDie Synthese und die Biotransformation des Neroloxids **101** finden sich in der Bachelorarbeit von *Nadja Kreuter* (Universität Gießen, „Enzymatische allylische Oxidation von heterozyklischen Aromastoffen“, 2011)

Im ersten Schritt wurde das Brom selektiv, mit einer guten Ausbeute von 77%, an eine der Doppelbindungen addiert. Der zweite Schritt beinhaltete eine Dehydrobromierung, wobei das Dien **100** als Produkt entsteht. Da diese Umsetzung nicht vollständig verlief, wurde das Produkt nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 38% erhalten. Im letzten Syntheseschritt wurde das Dien **100** mit einer Ausbeute von 91% säurekatalytisch zu Neroloxid **101** überführt.

Bei der Biotransformation von Neroloxid **101** wurde das eingesetzte Edukt mit einem Umsatz von 99% fast vollständig umgesetzt. Dabei entstanden zwei Hauptprodukte. Das GC-MS-Chromatogramm ist in **Abbildung 88** dargestellt.

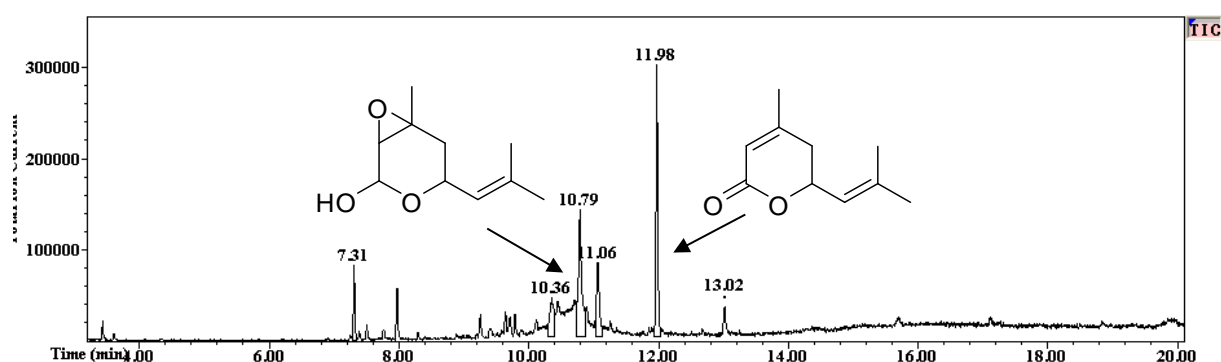


Abbildung 85: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von Neroloxid **101**.

Das Rohprodukt konnte säulenchromatographisch gereinigt werden. Das Lacton **102** wurde mit einer Ausbeute von 9% und das Epoxid **103** mit einer Ausbeute von 10% erhalten (**Abbildung 89**).

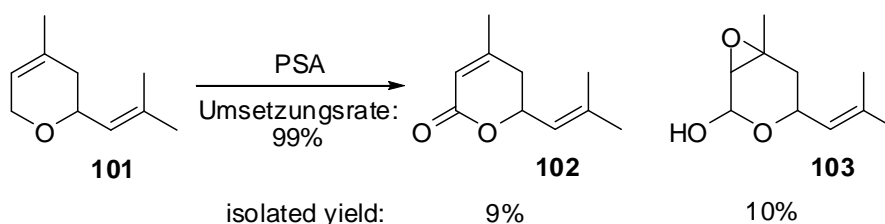


Abbildung 86: Biotransformation von Neroloxid **101**.

Die Bildung des Lactons **102** war vorhersagbar, denn das gebildete Allylradikal wird durch den benachbarten Sauerstoff stabilisiert. Zusätzlich wird an dieser Position eine geringere sterische Hinderung durch den Rest ausgeübt. Das Lacton **102** ist bereits literaturbekannt und soll nach Rohrzucker, ahornähnlich, grün und blumig duften.²⁴⁴

Das Molekül **103** ist in der Literatur nicht bekannt. Die Bildung dieses Moleküls **103** beweist, dass das Lyophilisat des Basidiomyceten *P. sapidus* in der Lage ist nicht nur an einer Stelle zu oxidieren, sondern an zwei Positionen gleichzeitig. Aufgrund seiner möglichen olfaktometrischen Eignung wurde das Rohprodukt mit Hilfe der Gaschromatographie olfaktometrisch untersucht. In **Abbildung 90** ist ein GCO-Chromatogramm der Biotransformationsprodukte dargestellt. Die Probe wurde insgesamt dreimal mit Hilfe der Gaschromatographie olfaktometrisch analysiert, um eindeutige Ergebnisse über den Geruch der enthaltenen Substanzen festhalten zu können.

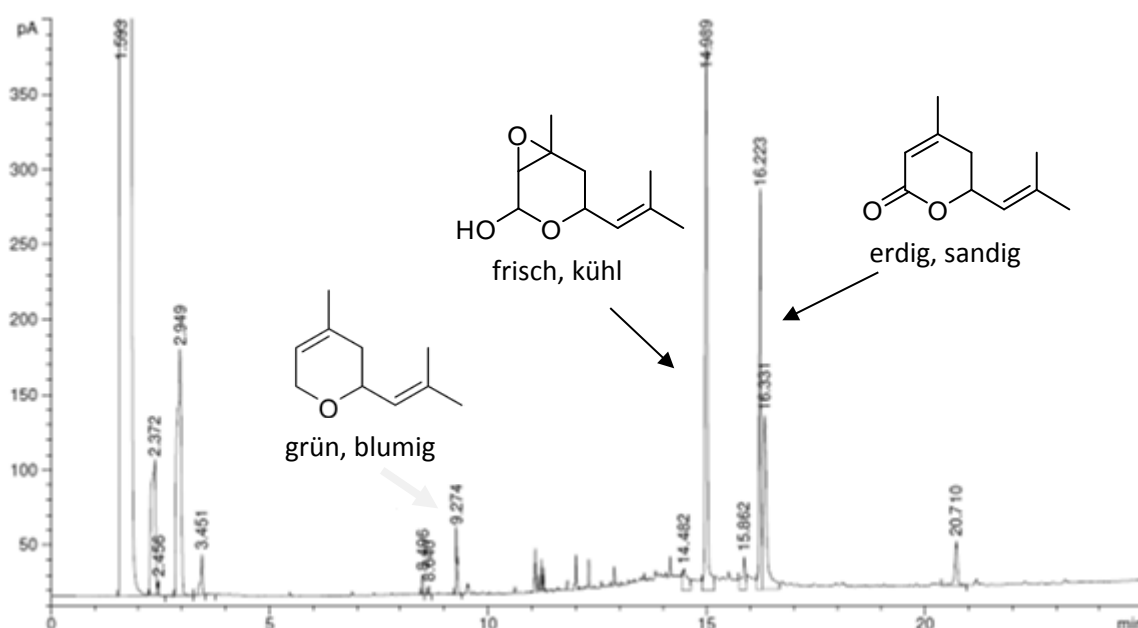


Abbildung 87: GC-O-Chromatogramm der Biotransformation von Neroloxid 101.

Bei dem Peak bei 8.5 min handelt es sich um Neroloxid **101**. Dieses zeigte einen grünen, blumigen und rosenähnlichen Geruch. Obwohl die Intensität des Peaks eher schwach war, war der Geruch sehr intensiv. Dies ist mit der niedrigen Geruchsschwelle von Neroloxid **101** zu erklären. Der Peak des Lactons **102** bei 16.2 min hatte ein sandiges und erdiges Aroma, welches jedoch wenig intensiv wahrgenommen wurde. Der Peak, des in der Literatur noch unbekannten Epoxids **103**, bei 14.9 min, vermittelte einen frischen, kühlenden Eindruck.

Synthese von Weinlacton **104**^{vi}

Das Weinlacton **104** gehört zu der Klasse der natürlichen *p*-Menthan-Monoterpene und repräsentiert gemeinsam mit dem Dillether **105**, dem Mintlacton **106** und dem Vespéral **107** wichtige Naturstoffe (**Abbildung 91**).²⁴⁵ Im Weißwein ist es zwar nur in Spuren enthalten, gilt aber als einer der Hauptgeschmacks- und Geruchsträger.²⁴⁶ Es weist einen angenehm süßen kokosnussartigen Geruch auf.²⁴⁷

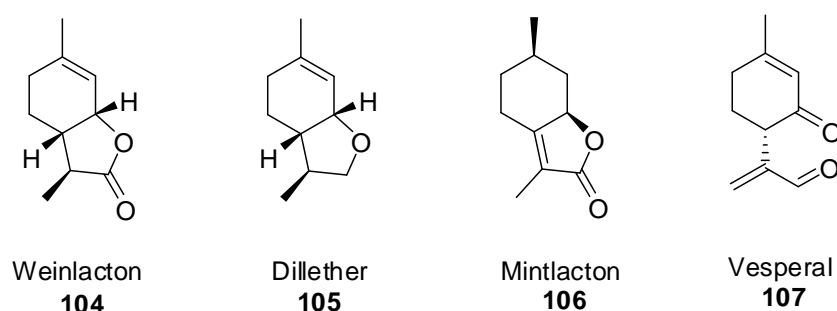


Abbildung 88 Beispiele für natürliche *p*-Menthan-Monoterpene.

Die Synthese von Weinlacton **104** ausgehend von Limonen **33** wurde von Guth *et al.* beschrieben.²⁴⁷ Als eine der Hauptchemikalien fand dabei das chromhaltige Oxidationsmittel PDC Verwendung. **Abbildung 92** zeigt die modifizierte Syntheseroute zur Darstellung von Weinlacton **104**. In diesem Fall gelang es, die gesundheitsschädliche Chemikalie PDC in der dritten Stufe durch den neuartigen, ungiftigen Biokatalysator zu ersetzen.

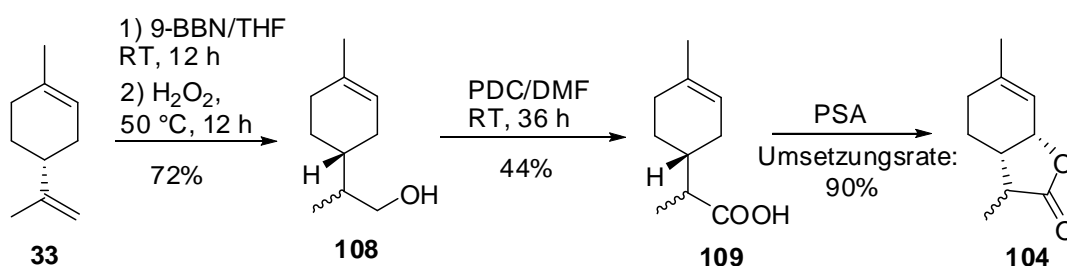


Abbildung 89: Modifizierte Syntheseroute zur Darstellung von Weinlacton **104**.

In Stufe eins wurde (*R*)-(+)-Limonen **33** durch Hydroborierung mit 9-BBN und anschließender Oxidation mit H₂O₂ zu dem diastereomeren Alkohol **108** umgesetzt. Das Rohprodukt wurde

^{vi} Die Synthese des Weinlactons **104** findet sich in der Bachelorarbeit von *Holger Kremer* (Universität Gießen, „Synthese und enzymatische Umsetzung von Weinlacton und dessen Derivaten“, 2011.)

säulenchromatographisch gereinigt und der primäre Alkohol **108** mit einer Ausbeute von 72% erhalten. Während der zweiten Synthesestufe wurde der zuvor hergestellte Alkohol **108** mittels PDC zur Carbonsäure **109** oxidiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurden 44% der viskosen, farblosen und klaren Carbonsäure **109** isoliert.

Die Biotransformation der diastereomeren Carbonsäure **109** mit dem Lyophilisat von *P. sapidus* erfolgte innerhalb von 12 h und das eingesetzte Edukt wurde mit einer Umsetzungsrate von 90% fast vollständig umgesetzt. Das GC-MS-Chromatogramm ist in **Abbildung 93** dargestellt.

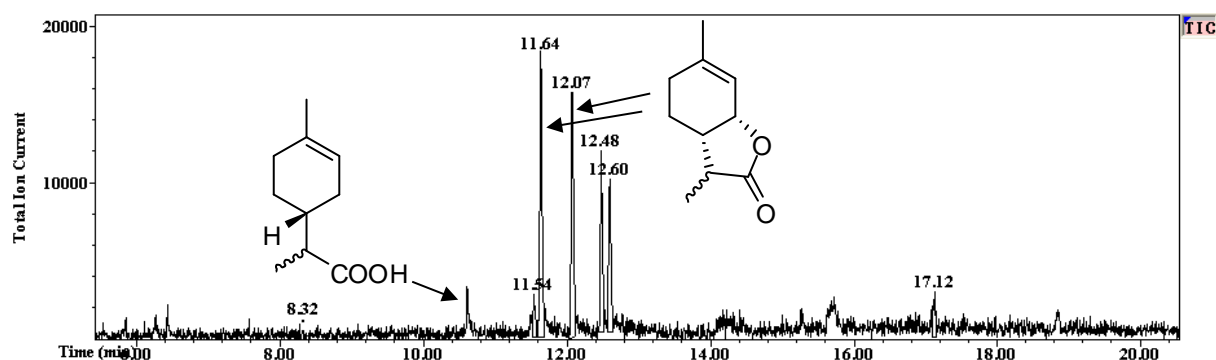


Abbildung 90: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von Carbonsäure **109**.

Das Biotransformationsprodukt konnte durch den Vergleich der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten als das Weinlacton **104** identifiziert werden.

Synthese von 3-Oxo- β -Ionon **110** und Dihydroactinidiolid **111**

Eine weitere interessante Anwendungsmöglichkeit für das Lyophilisat des *P. sapidus* ist die Synthese von Dihydroactinidiolid **111** und 3-Oxo- β -Ionon **110**. 3-Oxo- β -Ionon **110** ist ein C₁₃-Norisoprenoid und besitzt ein rauchiges, tabakähnliches Aroma.²⁴⁸ Dihydroactinidiolide **111** ist eine der Hauptkomponenten von Schwarztee aroma.²¹⁶ Es wurde aus verschiedenen Pflanzen, wie zum Beispiel aus der *Actinidia polygama*,²⁴⁹ isoliert und ist als ein Pheromon der Roten Feuerameise bekannt.²⁵⁰

Bosse *et al.*²¹⁶ beschreiben, dass Dihydroactinidiolid **111** aus dem Epoxid **39** durch Erhitzen auf 80 °C hergestellt werden konnte. Das als Vorläufer benötigte Epoxid lässt sich, wie die vorliegende Arbeit zeigen konnte, wiederum durch die Oxidation von β -Ionon **26** mit dem Lyophilisat von *P. sapidus* herstellen. Auf dieser Grundlage wurde β -Ionon **26** drei Tage mit dem Lyophilisat von *P. sapidus* umgesetzt. Die Biotransformation wurde mittels DC-Analytik auf ihre Vollständigkeit kontrolliert. Anschließend wurde das gesamte Reaktionsgemisch für 24 h bei 100 °C erhitzt (**Abbildung 94**).

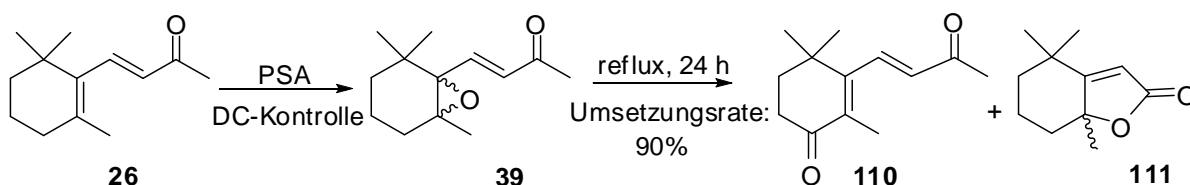


Abbildung 91: Synthese von 3-Oxo- β -Ionon **110** und Dihydroactinidiolid **111** aus β -Ionon **26**, mit dem Epoxid **39** als Intermediat.

Diese Methode hat einen entscheidenden Vorteil, denn das bei der Biotransformation gebildete Epoxid **39** konnte ohne Isolierung weiter umgesetzt werden. Erst nach dem zweiten Syntheseschritt erfolgte eine Aufarbeitung nach der Standardmethode, wobei genauso wie bei den anderen Biotransformationen verfahren wurde.

Das GC-MS-Chromatogramm ist in **Abbildung 95** dargestellt. Wie man daraus entnehmen kann, wurde das Epoxid **39** fast vollständig umgesetzt und die prozentuale Umsetzungsrate betrug 90%.

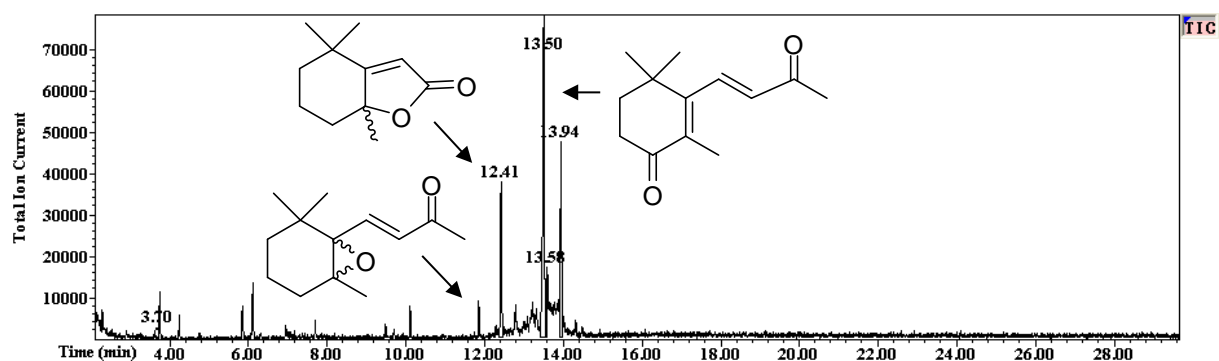


Abbildung 92: GC-MS-Chromatogramm der Synthese des α,β -ungesättigte Carbonyls **110 und des Dihydroactinidiolids **111**.**

Die Isolierung der reinen Produkte **110** und **111** war mittels Säulenchromatographie nicht möglich, da sämtliche Fraktionen als Mischfraktionen oder mit Nebenprodukten verunreinigt und in geringen Ausbeuten (zwischen 2 mg und 4 mg) erhalten wurden. Von den drei Hauptprodukten konnten jedoch zwei durch den Vergleich von Massenspektren und der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten identifiziert werden. Dabei handelte es sich um 3-Oxo- β -lonon **110** und um Dihydroactinidiolid **111**.

Zusammenfassung

Ziel dieser Doktorarbeit war die Prüfung des Anwendungspotenzials eines neuartigen Biokatalysators für das synthetisch organische Labor und die Evaluierung dessen Substratspektrums. Das Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* ist zur allylischen Oxidation von cyclischen Olefinen in der Lage und besitzt viele erfolgversprechende Eigenschaften. Es ist nicht giftig, sicher und einfach herzustellen, spezifisch in der Reaktion und zeigt ein breites Substratspektrum. Die katalytische Reaktion folgt den Regeln der Radikalchemie, weshalb die Regioselektivität gut vorhersagbar ist. Aus diesen Gründen ist der Biokatalysator sowohl fürs industrielle als auch fürs akademische Umfeld gut geeignet.

Basierend auf den Erkenntnissen der Biotransformation von Valencen **12** konnten zahlreiche weitere Mono- und Sesquiterpene erfolgreich biotransformiert werden. Um den neuartigen Biokatalysator in einem organisch chemischen Labor nutzen zu können, wurde zunächst ein Scale-up durchgeführt. Anschließend wurde eine Standardmethode entwickelt, um das größtmögliche Potenzial des Biokatalysators zu erreichen. Jedoch bietet vor allem die Aufarbeitung nach der Biotransformation Optimierungspotenzial. Dadurch wäre sicherlich auch eine Steigerung der Ausbeuten möglich.

Cyclohexen **45** und seine Derivate konnten erfolgreich zu Enonen und Allylalkoholen oxidiert werden. Substrate, welche das Cyclohexengrundgerüst enthalten, wurden bevorzugt umgesetzt. Hingegen konnte Cyclohepten **48** nur langsam und Cyclopenten **20** gar nicht biotransformiert werden. Eine benzyliche Oxidation mit dem Lyophilisat des *P. sapidus* ist grundsätzlich möglich, läuft aber mit geringeren Umsetzungsraten als die allylische Oxidation ab.

Bei vielen Substraten, einschließlich der heterocyclischen Substrate, war eine Umsetzung nur dann möglich, wenn ein stabilisiertes Radikal gebildet werden konnte. Bei den O-Heterocyclen wurde die Bildung von Lactonen bevorzugt und die Boc-geschützten N-Heterocyclen bildeten Diole, welche mittels Röntgendiffraktometrie vermessen werden konnten.

Mit Ausnahme des terpenoiden Citronellals **86** konnte kein weiteres acyclisches Substrat oxidiert werden. Mittels MALDI- und IR-Analytik konnte aber die Umsetzung des aus Polybutadien bestehenden Polyöls **110** bestätigt werden. Für zukünftige Projekte wäre eine vollständige Strukturaufklärung mit Hilfe von Modellverbindungen eventuell möglich.

In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Biokatalysator erfolgreich in mehrstufigen organischen Synthesen eingesetzt werden kann. Dadurch konnte zum Beispiel in der Synthese von Weinlacton **104** ein chromhaltiges Oxidationsmittel PDC vermieden werden. Bei der Biotransformation von Neroloxid **101** konnte ein neuartiges, nicht-literaturbekanntes Molekül **103** isoliert werden, welches ein interessantes Aromaprofil besitzt.

Abstract

The aim of this thesis was the examination of the synthetic potential of a new biocatalyst and the evaluation of its substrate spectrum. The lyophilisate of an edible fungus *Pleurotus sapidus* is able to perform the allylic oxidation of cyclic olefins and has many promising features. It is non-toxic, safe and readily available even for synthetic laboratories without microbiological expertise. In addition the reaction with the biocatalyst is specifically and has a broad substrate scope. The catalytic reaction works in accordance with the rules of radical chemistry, therefore the regioselectivity is well predictable. For these reasons the new biocatalyst is well suited for the application in industrial as well as in the academic area.

Based on the results of the biotransformation of valencene **12** numerous other mono- and sesquiterpenes have been successfully bioconverted. For using the novel biocatalyst in an organic laboratory, a scale-up was performed first. Subsequently, a standard method was developed. However, the work-up after the biotransformation provides still potential for optimization.

Cyclohexene **45** and its derivatives were successfully oxidized to enones and allyl alcohols. Substrates, which contain the cyclohexene backbone, were preferably converted. By contrast, cyclopentene **20** was not recognized as a substrate at all, and cycloheptene **48** was oxidized very slowly to the corresponding enone **49** and ketone **50**. Benzylic substrates were also converted by *PSA* although significantly slower than cycloalkenes.

Remarkable is the fact, that for many substrates, including heterocyclic substrates, a conversion was only possible, when a stabilized radical could be formed. O-heterocycles preferred the formation of lactones and Boc-protected N-heterocycles formed diols, which could be analyzed by X-ray diffraction.

With the exception of the terpenoic citronellal **86** no further acyclic substrates could be oxidized. The conversion of Polyöl 110, which consists of polybutadiene, has been verified by MALDI and IR-analytics. For future projects, a complete structural analysis using model compounds would be eventually possible.

In addition, this work shows that the biocatalyst can be successfully used for multistage organic synthesis. In the synthesis of winelactone **104** a chrome-VI-containing oxidadant PDC could be avoided. The bioconversion of neroloxide **101** resulted in an isolation of a new molecule **103**. This molecule **103** shows a very interesting aroma profile and is not known in the literature yet.

Experimenteller Teil

Reinigung

Säulenchromatographie

Bei der säulenchromatographischen Isolierung der Produkte wurde als Trennmittel Kieselgel der Firma Macherey und Nagel GmbH & Co. KG oder der Firma Merck KGaA, mit einer Korngröße von 60-200 µm verwendet. Zur Reinigung wurde ausschließlich die isokratische Methode genutzt.

Dünnschichtchromatographie

Für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden Fluorophor-beschichtete Kieselgelplatten (Kieselgel 60 F₂₅₄) mit einer Schichtdicke von 0.2 mm der Firma Macherey und Nagel GmbH & Co. KG oder der Firma Merck KGaA verwendet. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht (254 nm, 366 nm) oder mit folgenden Färbereagenzien.

Cersulfat:	5 g Ammoniummolybdat, 0.1 g Cer(IV)sulfat, 90 mL Wasser, 10 mL konz. Schwefelsäure
Molybdatophosphorsäure:	5 g Molybdatophosphorsäure, 100 mL Ethanol

Präparative Gaschromatographie

Für die präparative Gaschromatographie wurde das Gerät Fraktovap 2450 der Firma Carlo Erba verwendet.

Injektionssystem:	Injektor für gepackte Säule
Säule:	5% OV-101 auf Volaspher A2, Länge 2 m, Durchmesser 6 mm
Trärgas:	Helium
Temperaturprogramm:	von 80 °C auf 250 °C in 45 min
Detektor:	WLD

Analytik

NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden an den Geräten Avance II 200 MHz „Microbay“ (AV 200) und Avance II 400 MHz WB (AV 400), und Avance III 600 MHz (AV 600) der Firma Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten gemessen. Zur Bestimmung neuer Substanzen wurden zweidimensionale NMR-Messungen vorgenommen.

Chemische Verschiebungen sind als δ in ppm angegeben, kalibriert wurde auf nicht deuterierte Lösungsmittelsignale nach Literaturwerten.²⁵¹

Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm Topspin 3.1. Dabei werden die Signale der Protonenspektren wie folgt angegeben: chemische Verschiebung in ppm, Multiplizität, Integral, (wenn vorhanden) Kopplungskonstanten in Hertz, Zuordnung der Protonensignale. Die Zuordnung der Multiplizitäten erfolgt mit den üblichen Abkürzungen (s: Singulett, brs: breites Singulett, d: Dublett, dd: Dublett von Dublett, t: Triplet, q: Quartett, quin: Quintett, sxt: Sextett, m: Multipllett). Da einige Verbindungen als Diastereomere dargestellt wurden, zeigen manche ^{13}C -Signale einen doppelten / mehrfachen Signalsatz. Diese Signale werden mit C' gekennzeichnet.

Aufgrund der geringen synthetisierten Mengen zeigen einige Aufnahmen der ^{13}C -Spektren nur geringe Intensitäten. In einigen Fällen konnten Kohlenstoffsignale nur über 2D-Signale zugeordnet werden, bei anderen konnten sie gar nicht beobachtet werden.

Die NMR-Nummerierung der Produkte kann von der Empfehlung der IUPAC-Nomenklatur abweichen und somit nicht mit der Nomenklatur der Moleküle übereinstimmen. Auch die Nomenklatur der Substanzen entspricht aufgrund ihrer Komplexität nicht in allen Fällen den Empfehlungen nach IUPAC.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden mit einem MicroTOF der Firma Bruker Daltonik GmbH, Bremen, aufgenommen. Die Ionisierung erfolgte mittels Elektrospray. Das Massenspektrometer wurde unmittelbar vor der jeweiligen Probenmessung mit Natriumformiat-Clustern extern kalibriert und die Massenspektren wurden mit dem Programm Data Analysis ausgewertet.

Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID)

Die GC-FID-Chromatogramme wurden an einem Hewlett Packard 5890 Series II der Firma Agilent gemessen.

Injektionssystem:	Split
Säule:	UP-5, 5% Phenyl Methyl Siloxan, Länge 30 m, Durchmesser 250 µm
Trärgas:	Stickstoff
Temperaturprogramm:	von 100 °C auf 250 °C in 15 min
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID)

Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor (GC-MS)

Die GC-MS-Chromatogramme wurden an einem Hewlett Packard 5973 der Firma Agilent gemessen.

Injektionssystem:	Split
Säule:	HP-5, 5% Phenyl Methyl Siloxan, Länge 30 m, Durchmesser 250 µm
Trärgas:	Helium
Temperaturprogramm:	2 min bei 60 °C; von 60 °C auf 250 °C in 15 min
Detektor:	Massenspektrometer (MS)

Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor und Olfaktometrieport (GC-O)

Die GC-O-Chromatogramme wurden an einem Agilent 7890A der Firma Agilent Technologies gemessen.

Injektionssystem:	cold on-column
Säule:	HP-Innowax, Länge 30 m, Durchmesser 320 µm
Trärgas:	Wasserstoff
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ auf 240 °C (12 min)
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID)
Olfaktometrieport	Gerstel ODP 3

Berechnung der Kovats-Indizes

Die Kovats-Indizes wurden wie folgt berechnet:

$$KI = 100 \times z + 100 \frac{\lg t_{R'x} - \lg t_{R'z}}{\lg t_{R'z+1} - \lg t_{R'z}}$$

z = Anzahl der C-Atome des Alkans, das vor dem Analyten eluiert

$t_{R'x}$ = Netto-Retentionszeit des Analyten

$t_{R'z}$ = Netto-Retentionszeit des Alkans, das vor dem Analyten eluiert

$t_{R'z+1}$ = Netto-Retentionszeit des Alkans, das nach dem Analyten eluiert

Der Alkanreihenstandard enthielt alle homologen n-Alkane von C10 bis C18.

IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden mit einem IF S25 der Firma Bruker Optics, Ettlingen aufgenommen (Messbereich: 7000-400 cm^{-1} , max. Auflösung: 2 cm^{-1}). Gemessen wurden entweder ein KBr-Pressling oder ein Film der jeweiligen Substanz. Im Folgenden werden die charakteristischen Signale zwischen 600-4000 cm^{-1} wiedergegeben. Die Intensitäten der IR-Banden werden mit den üblichen Abkürzungen gekennzeichnet (s: stark, m: mittel, w: schwach, br: breit).

Röntgenstrukturanalyse

Die für die Röntgendiffraktion geeigneten Einkristalle wurden mit Hilfe von inertem Perfluoropolyether-Öl auf die Spitze eines Glasstabes aufgebracht. Die Aufnahme der kristallographischen Daten erfolgte an einem BRUKER Nonius Kappa CCD Diffraktometer, welches über ein Tieftemperatursystem verfügt. Für die Messung wurde Mo- K_{α} -Strahlung der Wellenlänge $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ verwendet. Die Lösung der Kristallstrukturen erfolgte unter Verwendung direkter Methoden mit SHELXS97 und SHELXL 2013. Die Strukturverfeinerung wurde unter Verwendung der full-matrix least squares Methode mit dem Programm SHELXL97 vorgenommen. Zur Darstellung der Strukturen diente das Programm ORTEP III (V 2.0).

Mikrobiologie: Geräte und sonstige Hilfsmittel

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Hilfsmittel.

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	LABOKLAV 25 Basic	SHP-Steriltechnik, Magdeburg
Autoklav	LABOKLAV 160 MSL	SHP-Steriltechnik, Magdeburg
Brutschrank	INE 500	Memmert, Schwabach
Sterile-Werkbank	HERA safe KS 18	Thermo Scientific (Karlsruhe)
Ultra-Turrax	T25 Digital	IKA, Staufen
Inkubationsschüttler	Orbitron	Infors HAT (Bottmingen, Schweiz)
E-Pure-Wasseranlage	arium 611 VF	Sartorius
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2 LD plus	CHRIST (Osterode, am Harz)
pH-Meter	SevenEasy S20	Mettler Toledo, Gießen

Kulturführung von Transformationskulturen

Verwendeter Mikroorganismus

Der in dieser Arbeit verwendeter Mikroorganismus wurde von der Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, bezogen.

Tabelle 3: Eingesetzter Mikroorganismus.

Organismus	Stamm-Nr.	Verwendung	Transformation durch
<i>Pleurotus sapidus</i>	DSMZ 8266	Biotransformation	Lyophilisate

Standard-Nähr-Lösung (SNL-Medium)

Die Kulturführung von *Pleurotus sapidus* erfolgte in einem SNL-Medium. Die in Tabelle 5 und 6 aufgeführten Bestandteile wurden in 1 L Reinstwasser gelöst und die Lösung wurde mit 1 M NaOH auf pH = 6 eingestellt. Das SNL-Medium wurde anschließend bei 121 °C im Autoklav sterilisiert. Das Medium wurde in Erlenmeyerkolben überführt, diese mit Cellulosestopfen verschlossen und mit Aluminiumfolie abgedeckt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des SNL-Mediums.

Substanz	Menge
Glucose-Monohydrat	30,0 g L ⁻¹
Asparagin-Monohydrat	4,50 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,50 g L ⁻¹
MgSO ₄ · H ₂ O	0,50 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,00 g L ⁻¹
Spurenelementlösung	1,00 mL L ⁻¹

Tabelle 5: Zusammensetzung der Spurenelementlösung.

Substanz	Menge
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	5 mg L ⁻¹
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	80 mg L ⁻¹
MnSO ₄ · 1 H ₂ O	30 mg L ⁻¹
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	90 mg L ⁻¹
EDTA	400 mg L ⁻¹

SNL-H-Agar

Für die Plattenkultivierung wurden dem SNL-Medium zusätzlich 15,0 g L⁻¹ Agar-Agar vor dem Autoklavieren zugegeben.

Stammkultivierung

Von dem verwendeten Pilz-Stamm wurde eine Stammkultur auf Agarplatte mit SNL-H-Agar-Medium angelegt. Dazu wurde eine Agarplatte mit einem ca. 1 cm² großen, mit Mycel bewachsenen Agarstück beimpft, mit Parafilm verschlossen und im Brutschrank bei 24 °C kultiviert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Die Stammkultur wurde mindestens alle 6 Monate erneuert.

Vorkultur

Für die Vorkultur wurde ein ca. 1 cm² großes, mycelbewachsenes Agarstück steril aus einer Agar-Stammkultur geschnitten und in einen 250 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL SNL-Medium überführt. Nach dem Homogenisieren des Agarstücks mittels Ultraturraxstab wurde der Erlenmeyerkolben für 4 Tage bei 24 °C und 150 rpm im Schüttelschrank unter Lichtausschluss inkubiert.

Hauptkultur

Die Vorkultur wurde zunächst mit dem Ultraturraxstab homogenisiert. Für die Hauptkultur wurden 20 mL der Vorkultur in einen 500 mL Erlenmeyerkolben mit 180 mL SNL-Medium überführt. Die Kultur wurde unter Lichtausschluss 4 Tage bei 24 °C und 150 rpm inkubiert.

Herstellung von Lyophilisaten

Die Zellmasse wurde über ein Baumwolltuch filtriert und mit kaltem dest. Wasser gewaschen. Das Mycel wurde in einen 1 L Rundkoben überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für 3 Tage gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in Falcontubes aliquotiert und bei -18 °C gelagert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift

AV 1: Biotransformation mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus*

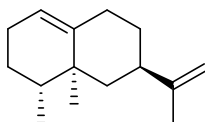
In einem 100 mL Rundkolben wurde das Lyophilisat (600 mg) in Tris-HCl-Puffer (30 mL, 20 mM, pH = 7,5) suspendiert und mit Substrat (1 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei RT und 900 rpm gerührt.

Nach 24 h wurde eine Probe (500 µL) entnommen, dreimal mit Et₂O/Pentan (0,5 mL, v/v 1:1) extrahiert und mittels GC-FID analysiert. Sofern das Edukt noch nicht vollständig umgesetzt war, wurden Lyophilisat (200 mg) und Tris-HCl-Puffer (10 mL, 20 mM, pH = 7,5) hinzugefügt und für weitere 24 h, bei RT gerührt.

Anschließend wurde dem Reaktionsgemisch Et₂O/Pentan (50 mL, v/v 1:1) zugesetzt und 10 min gerührt. Das Lyophilisat wurde mit Hilfe eines Büchnertrichters entfernt. Nach dem Trennen der Phasen wurde dreimal mit Et₂O/Pentan (50 mL, v/v 1:1) extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Der Extrakt wurde mittels Destillation an einer Vigreux-Kolonnen auf 1 mL eingeeengt und das erhaltene Produkt wurde anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten identifiziert. War dies nicht möglich, so wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch bzw. gaschromatographisch gereinigt und mittels NMR- bzw. HRMS-Analytik identifiziert.

Biotransformation von Terpenen

Biotransformation von (+)-Valencen 12



Die Biotransformation von Valencen **12** (55 μ L, 0,25 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Pentan/ Et_2O , v/v 1:1) und Nootkaton **15** (15 mg, 0,07 mmol, 28%) als eine gelbe, ölige Substanz isoliert.

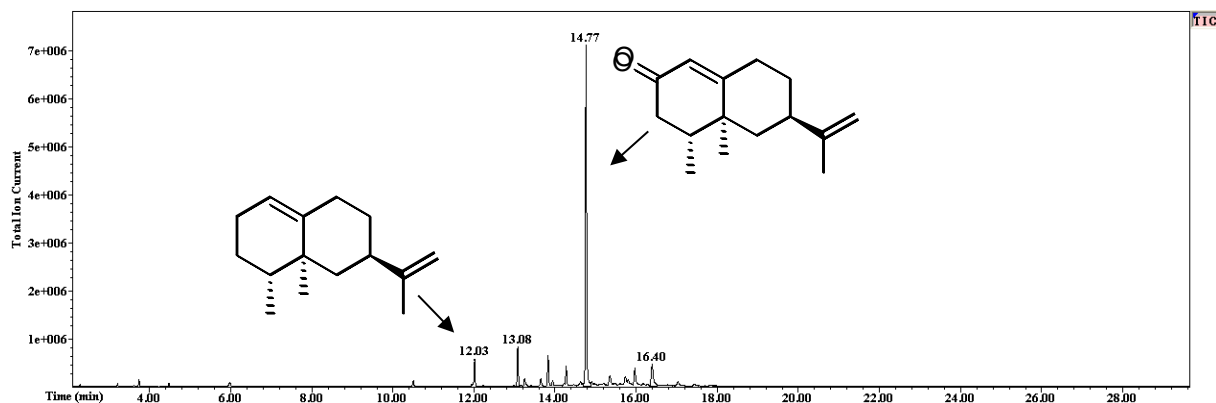
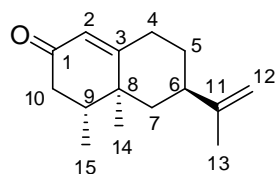


Abbildung 93: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von Valencen **12**.

(+)-Nootkaton 15



R_f - Wert = 0,5 (Pentan/ Et_2O , v/v 1:1, Molybdätposphorsäure).

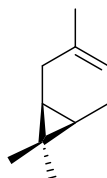
KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1856. (Literaturwert 1834.)²⁵²

GC-MS m/z (%): 218 (12, M^+), 203 (27, $\text{M} - \text{Me}$), 200 (20, $\text{M} - \text{H}_2\text{O}$), 190 (31, $\text{M} - \text{C}_2\text{H}_4$), 176 (20, $\text{M} - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}$), 175 (25, $\text{M} - \text{C}_3\text{H}_7$), 162 (17, $\text{M} - \text{C}_4\text{H}_8$), 147 (64, $\text{M} - \text{C}_4\text{H}_8 + \text{Me}$), 146 (41, $\text{M} - 72$), 133 (52, $\text{M} - 85$), 121 (61, $\text{M} - 97$), 108 (47, $\text{M} - 110$), 107 (37, $\text{M} - 111$), 105 (50, $\text{M} - 113$), 93 (61, $\text{M} - 125$), 91 (83, $\text{M} - 127$), 80 (44, $\text{M} - 138$), 79 (82, $\text{M} - 139$), 77 (57, $\text{M} - 141$).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.76 (s, 1H, 2-H), 4.75-4.72 (m, 2H, 12-H), 2.56-2.47 (m, 1H, 6-H), 2.40-2.20 (m, 4H, 4-H, 10-H), 2.05-1.88 (m, 3H, 9-H, 5-H), 1.73 (s, 3H, 13-H), 1.40-1.30 (m, 2H, 5-H), 1.11 (s, 3H, 14-H), 0.96 (d, 3H, $^3J = 6.87$ Hz, 15-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 200.0 (C1), 170.7 (C3), 149.3 (C11), 124.8 (C2), 109.4 (C12), 44.1 (C7), 42.2 (C10), 40.6 (C6), 40.5 (C8), 39.5 (C9), 33.2 (C4), 31.8 (C5), 21.0 (C13), 17.0 (C14), 15.1 (C15).

Biotransformation von 3-Caren 24



Die Biotransformation von 3-Caren **24** (100 μL , 0,63 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Pentan/ Et_2O , v/v 10:1) und 3-Caren-5-on **35** (28 mg, 0,19 mmol, 30%) als eine gelbe, ölige Substanz isoliert.

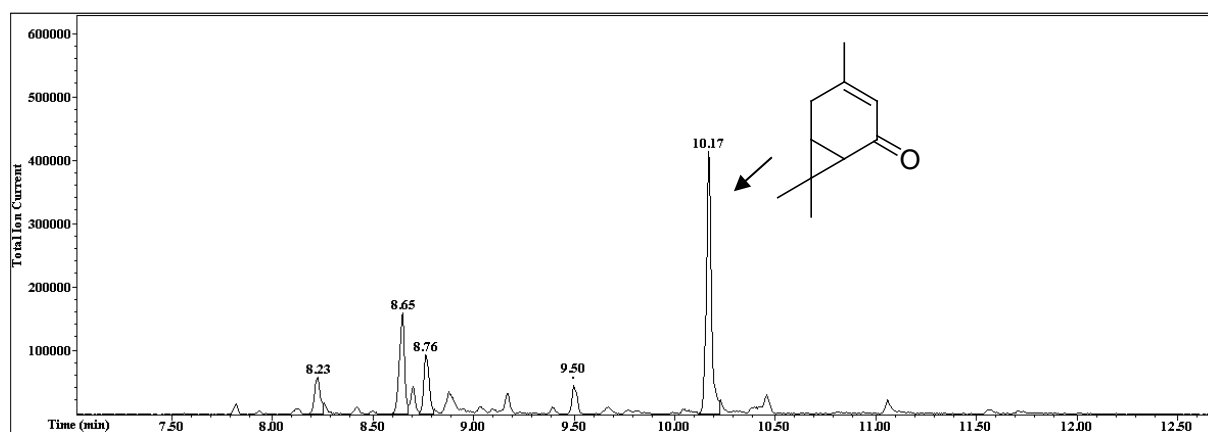
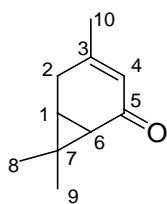


Abbildung 94: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von 3-Caren 24.

3-Caren-5-on 35

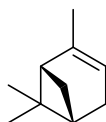
R_f - Wert = 0,3 (Pentan/ Et_2O , v/v 1:1, Molybdätdiäthylphosphorsäure).

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1333. (Literaturwert 1314)²⁵³

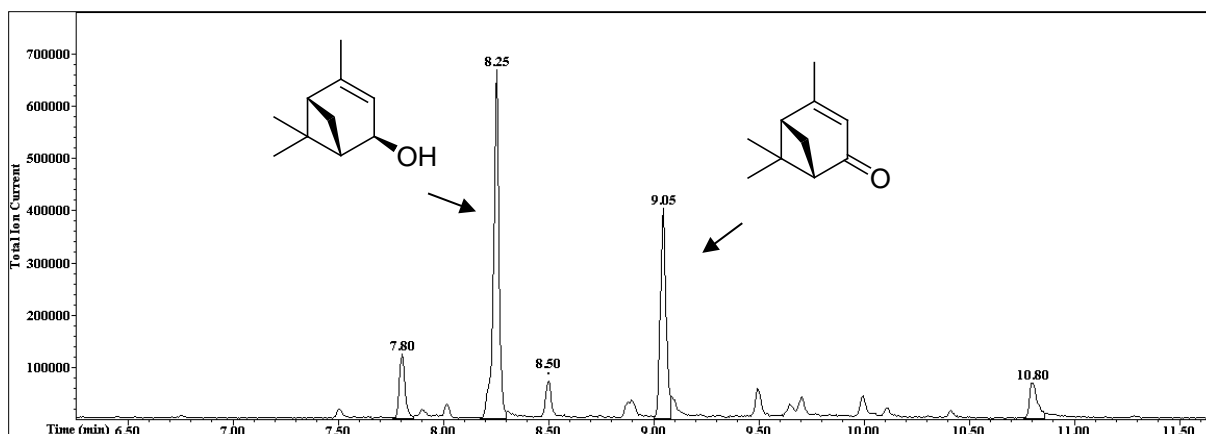
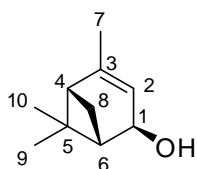
GC-MS m/z (%): 150 (48, M^+), 135 (20, $\text{M} - \text{Me}$), 107 (100, $\text{M} - \text{C}_3\text{H}_7$), 91 (81, $\text{M} - \text{CH}_3\text{O} + \text{H}_2\text{O}$), 79 (60, $\text{M} - \text{C}_4\text{H}_8 + \text{Me}$).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.82 (s, 1H, 4-H), 2.63 (dd, 1H, $^2J = 20.37$ Hz, $^3J = 8.24$ Hz, 2-H), 2.32 (d, 1H, $^3J = 20.75$ Hz, 2-H), 1.86 (s, 3H, 10-H), 1.55 (d, 1H, $^3J = 7.41$ Hz, 6-H), 1.44 (t, 1H, $^3J = 8.00$ Hz, 1-H), 1.18 (s, 3H, 9-H), 1.03 (s, 3H, 8-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 196.8 (C5), 159.1 (C3), 126.5 (C4), 33.0 (C6), 28.6 (C9), 28.0 (C2), 26.0 (C1), 23.9 (C10), 22.7 (C7), 14.5 (C8).

Biotransformation von α -Pinen 25

Die Biotransformation von α -Pinen **25** (97 μL , 0,63 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel (Laufmittel: Pentan/ Et_2O , v/v 9:1) konnten *trans*-Verbenol **37** (16 mg, 0,11 mmol, 18%) und Verbenon **36** (33 mg, 0,22 mmol, 37%) isoliert werden.

Abbildung 95: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von α -Pinen 25.**trans-Verbenol 37**

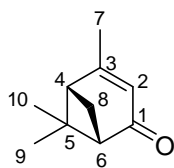
R_f - Wert = 0,2 (Pentan/ Et_2O , v/v 1:1, Molybdätdiäthylphosphorsäure).

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1159. (Literaturwert 1145)²⁵⁴

GC-MS m/z (%): 152 (M^+), 134 (15, $\text{M} - \text{H}_2\text{O}$), 119 (45, $\text{M} - \text{Me} - \text{H}_2\text{O}$), 91 (100, $\text{M} - \text{C}_3\text{H}_7 + \text{H}_2\text{O}$), 77 (25, $\text{M} - 75$).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.35-5.34 (m, 1H, 2-H), 4.27-4.26 (m, 1H, 1-H), 2.28-2.23 (m, 1H, 4-H), 2.19-2.15 (m, 1H, 6-H), 2.04-2.01 (m, 1H, 8-H), 1.72 (t, 3H, $^3J = 1.5$ Hz, 7-H), 1.32 (s, 3H, 9-H/10-H), 1.30-1.25 (m, 1H, 8-H) 0.87 (s, 3H, 9-H/10-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 149.1 (C3), 118.9 (C2), 70.7 (C1), 48.3 (C6), 47.3 (C4), 46.4 (C5), 28.8 (C8), 26.8 (C9/C10), 22.8 (C9/C10), 20.6 (C7).

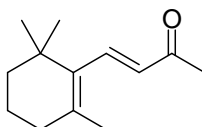
Verbenon 36

R_f - Wert = 0,3 (Pentan/ Et_2O , v/v 1:1, Molybdätdiäthylphosphorsäure).

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1227. (Literaturwert 1218)²⁵²

GC-MS m/z (%): 150 (34, M^+), 135 (61, M - Me), 107 (100, M - C_3H_7), 91 (72, M - 59), 80 (53, M - 70), 79 (46, M - 71), 67 (23, M - 83), 55 (25, M - 95).

Biotransformation von β -Ionon 26



Die Biotransformation von β -Ionon **26** (51 μ L, 0,25 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Pentan/ Et_2O , v/v 10:1). β -Ionon-4,5-Epoxid **39** (19 mg, 0,10 mmol, 40%) wurde als eine gelbe, ölige Substanz erhalten.

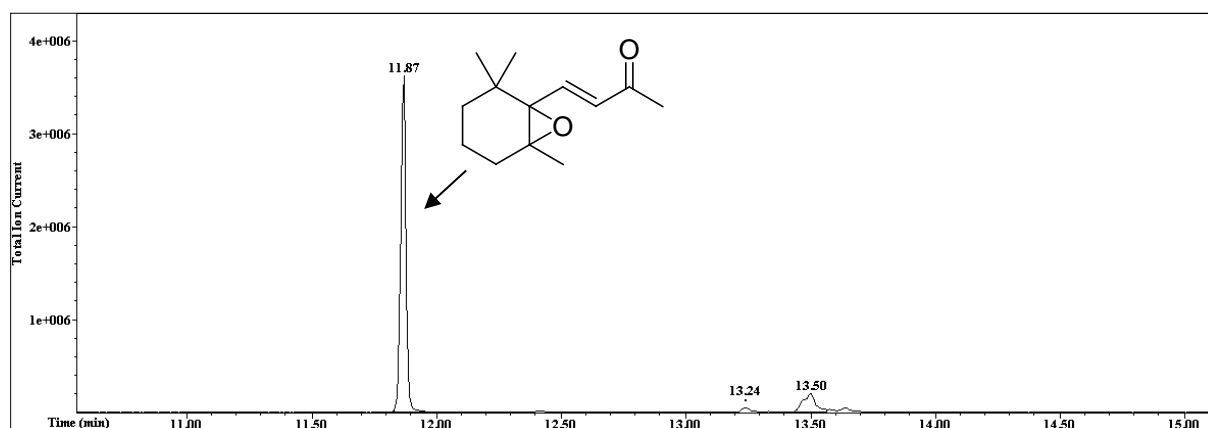
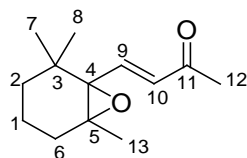


Abbildung 96: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von β -Ionon 26.

β -Ionon-4,5-Epoxid 39



R_f - Wert = 0,7 (Pentan/ Et_2O , v/v 1:1, Molybdätdiäthylphosphorsäure).

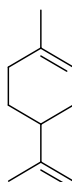
KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1506.

GC-MS m/z (%): 208 (3, M^+), 190 (18, $M - H_2O$), 175 (50, $M - Me - H_2O$), 123 (95, $M - 85$), 69 (84, $M - 139$).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.01 (d, 1H, $^3J = 15.86$, 10-H), 6.28 (d, 1H, $^3J = 15.86$, 9-H), 2.27 (s, 3H, 12-H), 1.94-1.86 (m, 1H, 6-H), 1.78 - 1.72 (m, 1H, 6-H), 1.49-1.41 (m, 3H, 1-H, 2-H), 1.14 (s, 6H, 7-H, 13-H), 1.09-1.05 (m, 1H, 2-H), 0.91 (s, 3H, 8-H).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 197.7 (C11), 142.8 (C10), 132.6 (C9), 70.7 (C4), 66.0 (C5), 35.6 (C2), 33.7 (C3), 30.0 (C6), 28.4 (C12), 26.0 (C7), 25.9 (C13), 20.9 (C8), 17.0 (C1).

Biotransformation von (+/-)-Limonen **33**



Die Biotransformation von (+/-)-Limonen **33** (41 μ L, 0,25 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. Carvon **40** wurde anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit denen eines authentischen Standards und den Literaturdaten, identifiziert. Die prozentuale Umsetzungsrate betrug 18%.

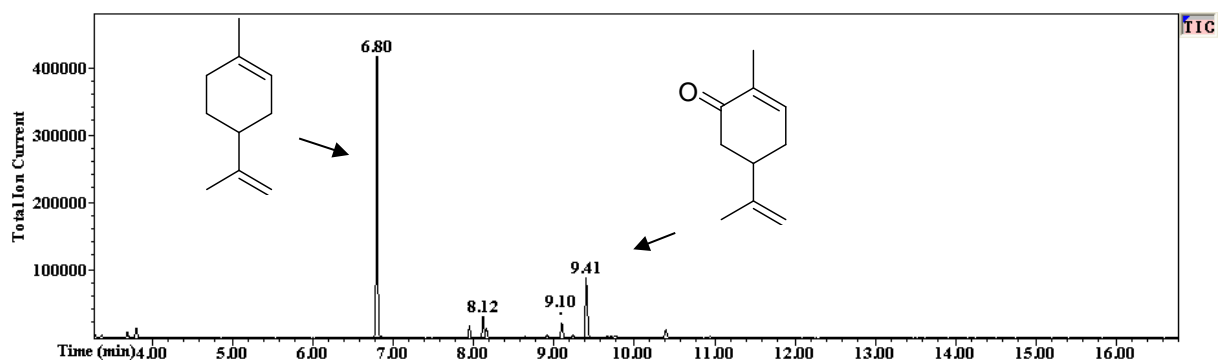
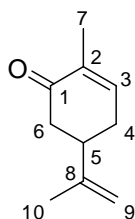
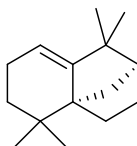


Abbildung 97: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von (+/-)-Limonen **33**.

(+/-)-Carvon 40

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1266. (Literaturwert 1248)²⁵⁵

GC-MS *m/z* (%): 150 (3, M^+), 108 (19, $M - C_2H_2O$), 93 (34, $M - 57$), 82 (100, $M - 68$), 79 (19, $M - 71$), 54 (75, $M - 96$).

Biotransformation von (-)-Isolongifolen 31

Die Biotransformation von (-)-Isolongifolen **31** (55 μ L, 0,25 mmol) wurde nach **AV 2** durchgeführt. Insgesamt wurden 1000 mg Lyophilisat verbraucht und die Reaktionsdauer betrug 3 Tage. (-)-Isolongifolen-9-on **42** wurde anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten identifiziert. Die prozentuale Umsetzungsrate betrug 37%.

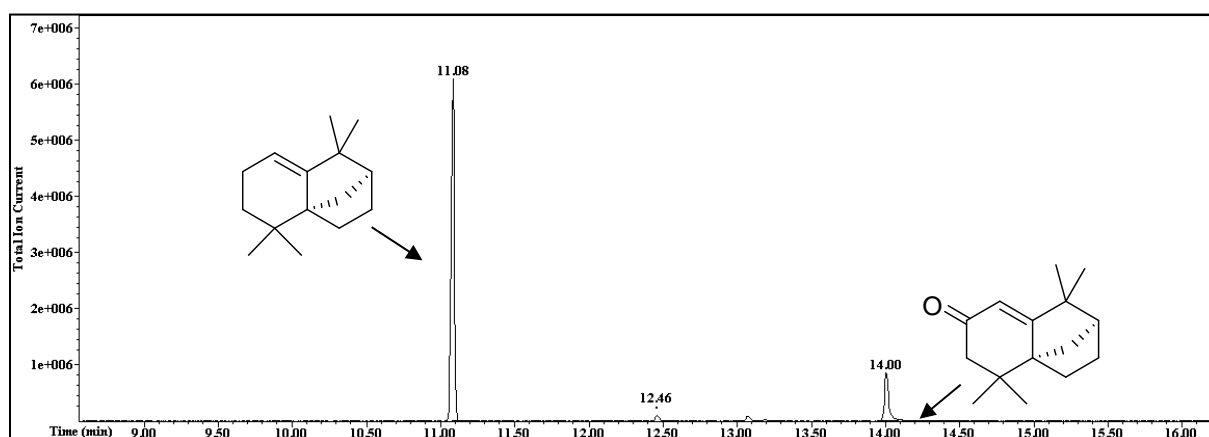
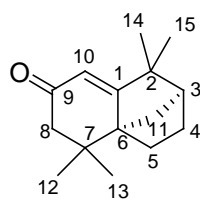
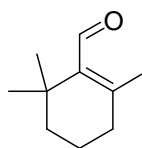


Abbildung 98: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von (-)-Isolongifolen **31**.

(-)-Isolongifolen-9-on 42

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1762. (Literaturwert 1728)²⁵⁶

GC-MS m/z (%): 218 (39, M^+), 203 (11, $M - \text{Me}$), 175 (96, $M - 43$), 162 (80, $M - \text{C}_4\text{H}_8$), 147 (67, $M - 71$), 133 (35, $M - 85$), 119 (50, $M - 99$), 105 (49, $M - 113$), 91 (100, $M - 127$), 77 (47, $M - 141$).

Biotransformation von β -Cyclocitral 32

Die Biotransformation von Cyclocitral **32** (200 μL , 1,21 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. 1-Cyclohexen-1-Carbonsäure **43** wurde anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten identifiziert. Die prozentuale Umsetzungsrate betrug 90%.

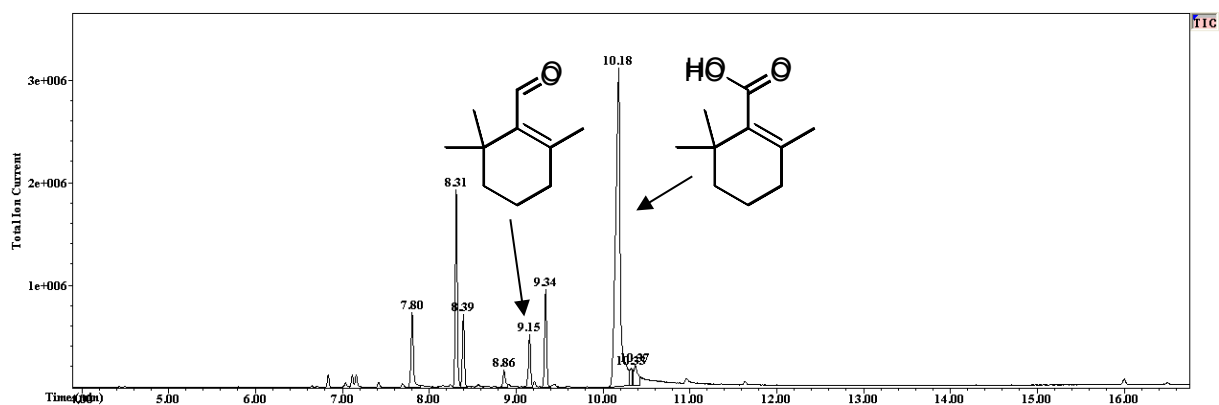
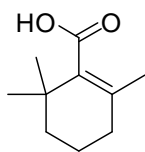
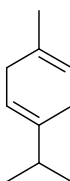


Abbildung 99: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von Cyclocitral 32.

1-Cyclohexen-1-Carbonsäure 43

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1343.

GC-MS *m/z* (%): 168 (18, M^+), 153 (100, $M - Me$), 135 (36, $M - 33$), 123 (38, $M - 45$), 107 (61, $M - 61$), 91 (26, $M - 77$), 79 (28, $M - 89$).

Biotransformation von γ -Terpinen 34

Die Biotransformation von γ -Terpinen **34** (40 μ L, 0,25 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. Die prozentuale Umsetzungsrate betrug 99%. Da das Produkt aufgrund der annähernd vollständigen Umsetzung bereits in akzeptabler Reinheit vorlag, konnte es anhand der NMR-Analytik als *p*-Cymol **44** (13 mg, 0,10 mmol, 39%) identifiziert werden.

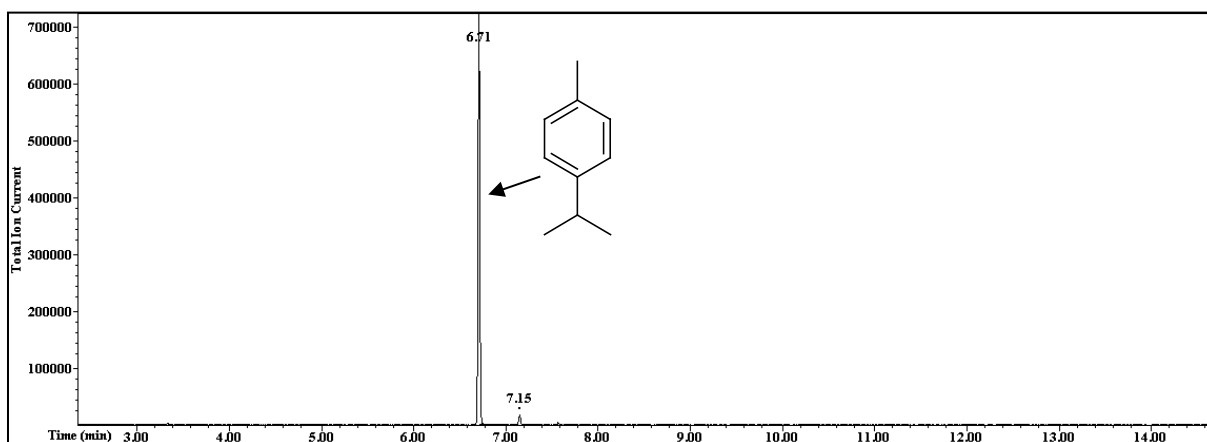
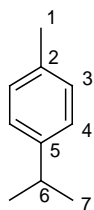


Abbildung 100: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von γ -Terpinen **34**.

***p*-Cymol 44**

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1036. (Literaturwert: 1030)²⁵⁷

GC-MS *m/z* (%): 134 (24, M⁺), 119 (100, M - Me), 117 (16, M - 17), 91 (34, M - C₃H₇), 77 (13, M - 57), 65 (13, M - 69).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.14 - 7.10 (m, 4H, 3-H, 4-H), 2.89 - 2.85 (m, 1H, 6-H), 2.31 (s, 3H, 1-H), 1.25 - 1.23 (d, 6H, ³*J* = 7.0 Hz, 7-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 146.0 (C5), 135.3 (C2), 129.1 (C3/C4), 126.4 (C3/C4), 33.8 (C6), 24.2 (C7), 2.1 (C1).

Biotransformation von Cyclohexen und Cyclohexenderivaten

Biotransformation von Cyclohexen **45**



Die Biotransformation von Cyclohexen **45** (101 μ L, 0,99 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. Die prozentuale Umsetzungsrate betrug 97%. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Pentan/ Et_2O , v/v 9:1). Dabei wurden 2-Cyclohexen-1-on **46** (21 mg, 0,22 mmol, 22%) und ein Isomerengemisch (3% ee) aus 2-Cyclohexen-1-ol **47** (27 mg, 0,28 mmol, 28%) als farblose Flüssigkeiten erhalten. Die Produkte wurden anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten identifiziert.

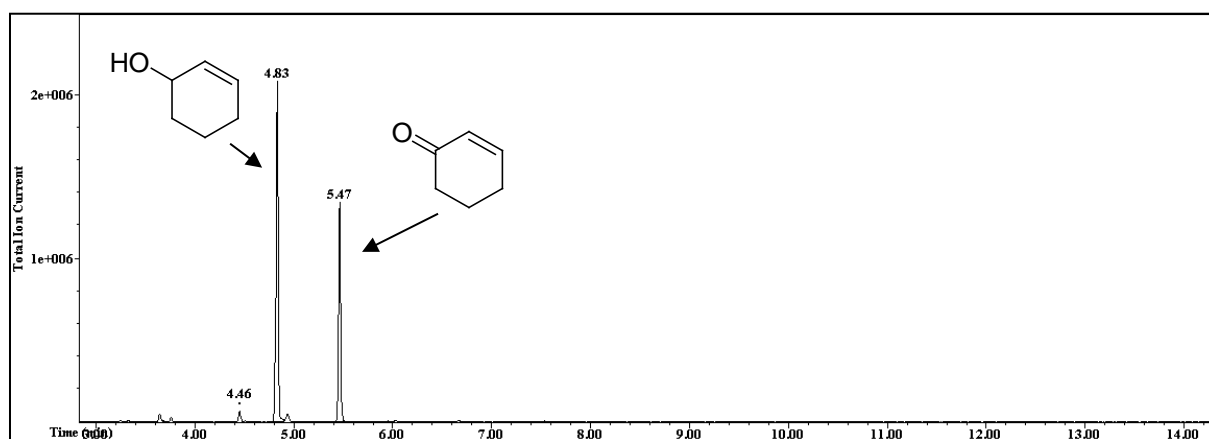
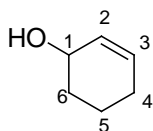


Abbildung 101: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von Cyclohexen **45**.

2-Cyclohexen-1-ol **47**

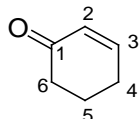


R_f - Wert = 0,3 (Pentan/ Et_2O , v/v 1:1, Molybdätdiäthylphosphorsäure).

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 891. (Literaturwert: 887)²⁵⁸

GC-MS m/z (%): 98 (22, M^+), 97 (30, $M - 1$), 83 (40, $M - \text{Me}$), 79 (77, $M - 19$), 77 (40, $M - 21$), 70 (100, $M - 28$).

2-Cyclohexen-1-on **46**



R_f - Wert = 0,4 (Pentan/ Et_2O , v/v 1:1, Molybdätdiäthylphosphorsäure).

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 914. (Literaturwert: 920)²⁵⁹

GC-MS m/z (%): 96 (24, M^+), 68 (100, $M - \text{C}_2\text{H}_4$).

Biotransformation von Cyclohepten **48**



Die Biotransformation von Cyclohepten **48** (58 μL , 0,51 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. Cycloheptanon **50** und Cyclohepten-1-on **49** wurden anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten identifiziert. Die prozentuale Umsetzungsrate betrug 51%.

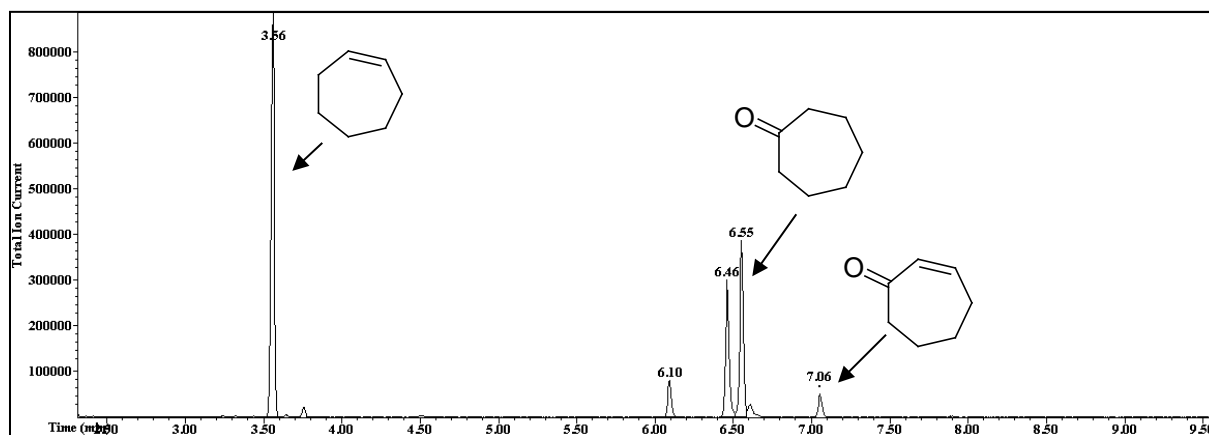
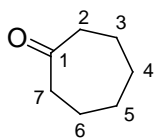
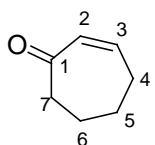


Abbildung 102: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von Cyclopenten **48**.

Cycloheptanon 50

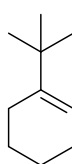
KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1033. (Literaturwert 1015)²⁶⁰

GC-MS m/z (%): 112 (22, M^+), 84 (20, $M - C_2H_4$), 68 (63, $M - 44$), 55 (100, $M - 57$).

Cyclohepten-1-on 49

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1071. (Literaturwert 1024)²⁶¹

GC-MS m/z (%): 110 (30, M^+), 81 (98, $M - 29$), 68 (59, $M - 42$), 67 (71, $M - 43$), 66 (68, $M - 44$), 54 (100, $M - 56$).

Biotransformation von 1-*tert*-Butylcyclohexen 51

Die Biotransformation von 1-*tert*-Butylcyclohexen **51** (42 μ L, 0,25 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. 3-*tert*-Butylcyclohexen-1-on **52** wurde anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten identifiziert. Die prozentuale Umsetzungsrate betrug 80%.

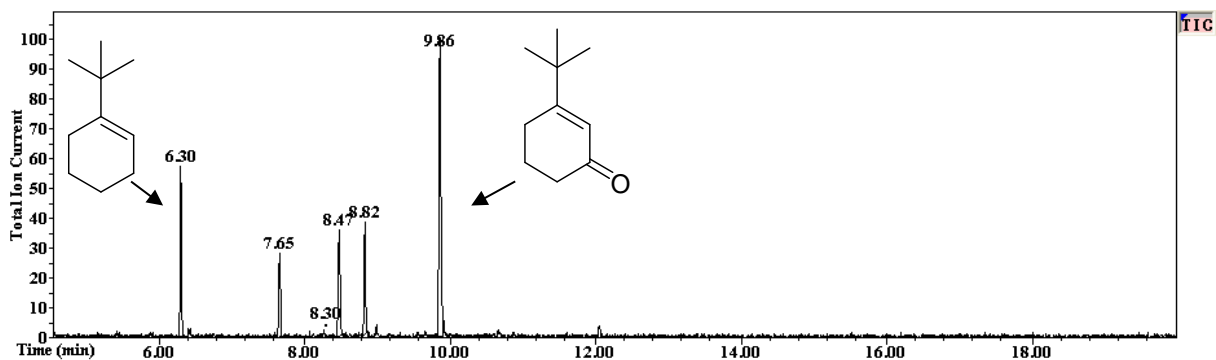
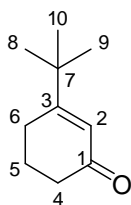


Abbildung 103: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von 1-*tert*-Butylcyclohexen **51**.

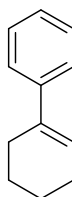
3-*tert*-Butylcyclohexen-1-on **52**



KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1308.

GC-MS m/z (%): 152 (26, M^+), 137 (8, $M - CH_3$), 124 (27, $M - C_2H_4$), 109 (100, $M - C_3H_7$), 96 (94, $M - 56$), 81 (40, $M - 71$), 67 (58, $M - 85$), 57 (55, $M - 95$), 55 (31, $M - 97$), 51 (27, $M - 101$).

Biotransformation von 1-Phenylcyclohexen **54**



Die Biotransformation von 1-Phenylcyclohexen **54** (40 μ L, 0,25 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. 1-Phenylcyclohexenon **55** wurde anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten identifiziert. Die prozentuale Umsetzungsrate betrug 99%.

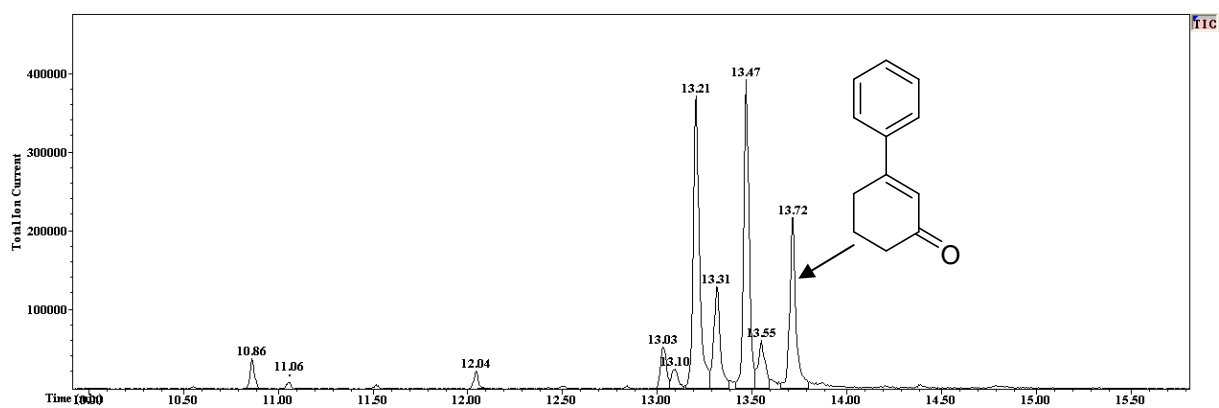
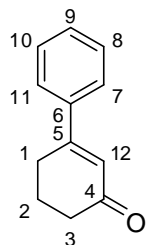


Abbildung 104: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von 1-Phenylcyclohexen 54.

1-Phenylcyclohexenon 55

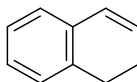


KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1787.

GC-MS m/z (%): 172 (43, M^+), 144 (79, $M - 28$), 129 (12, $M - 43$), 115 (100, $M - 57$), 102 (17, $M - 70$), 89 (15, $M - 83$), 77 (19, $M - 95$), 63 (21, $M - 109$), 51 (38, $M - 121$).

Biotransformation von Aromaten

Biotransformation von 1,2-Dihydronaphthalin **59**



Die Biotransformation von 1,2-Dihydronaphthalin **59** (45 μ L, 0,25 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. Naphthalin **62** und 1,2-Dihydronaphthalin-3-ol **63** wurden anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten identifiziert. Die prozentuale Umsetzungsrate betrug 84%.

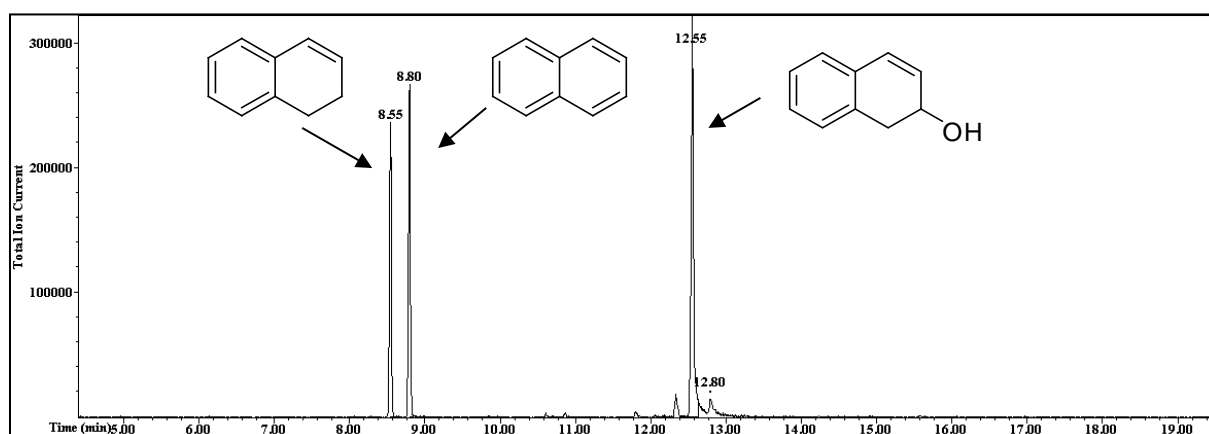
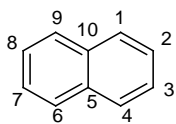


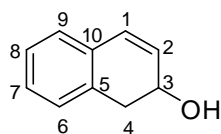
Abbildung 105: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von 1,2-Dihydronaphthalin **59**.

Naphthalin **62**



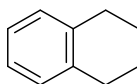
KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1211 (Literaturwert: 1151)²⁶²

GC-MS m/z (%): 128 (100, M^+), 102 (10, $M - C_2H_2$).

1,2-Dihydronaphthalin-3-ol 63

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1584

GC-MS m/z (%): 146 (46, M^+), 115 (62, $M - CH_3O$), 104 (100, $M - C_2H_2O$).

Biotransformation von Tetrahydronaphthalin 60

Die Biotransformation von Tetrahydronaphthalin **60** (34 μ L, 0,25 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. 1,2-Dihydronaphthalin-1-ol **64** und Tetrahydronaphthalin-1-on **65** wurden anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten identifiziert. Die prozentuale Umsetzungsrate betrug 43%.

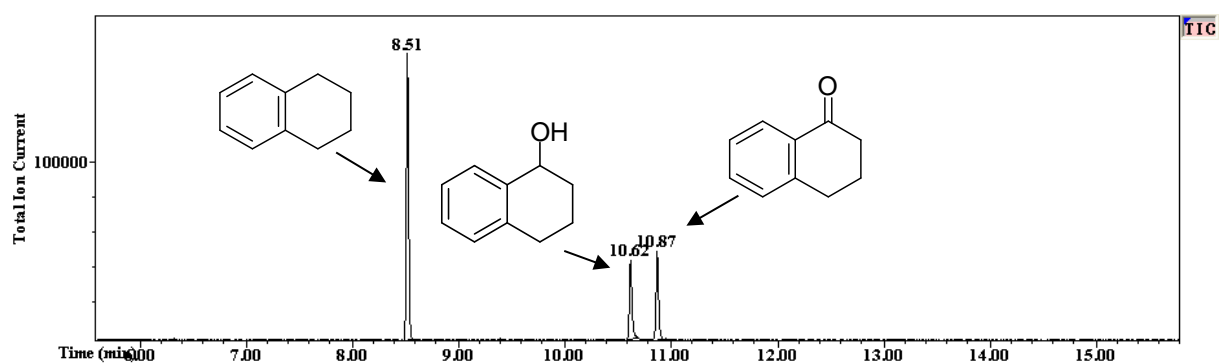
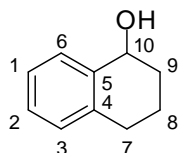


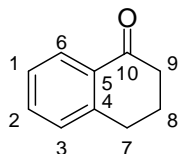
Abbildung 106: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von Tetrahydronaphthalin 60.

1,2-Dihydronaphthalin-1-ol 64

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1382.

GC-MS m/z (%): 146 (3, M^+), 130 (100, - 16), 128 (81, M - 2), 115 (52, M - CH_3), 102 (16, M - 28), 91 (10, M - 39), 77 (24, M - 53), 63 (40, M - 67), 51 (64, M - 79).

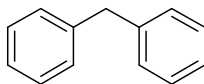
Tetrahydronaphthalin-1-on **65**



KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1410.

GC-MS m/z (%): 146 (36, M^+), 131 (16, M - CH_3), 118 (100, M - 28), 115 (17, M - 31), 90 (88, M - 56), 77 (11, M - 69), 63 (41, M - 83), 51 (32, M - 95).

Biotransformation von Diphenylmethan **61**



Die Biotransformation von Diphenylmethan **61** (42 μ L, 0,25 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. Benzophenon **66** konnte anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten identifiziert werden. Die prozentuale Umsetzungsrate betrug 18%.

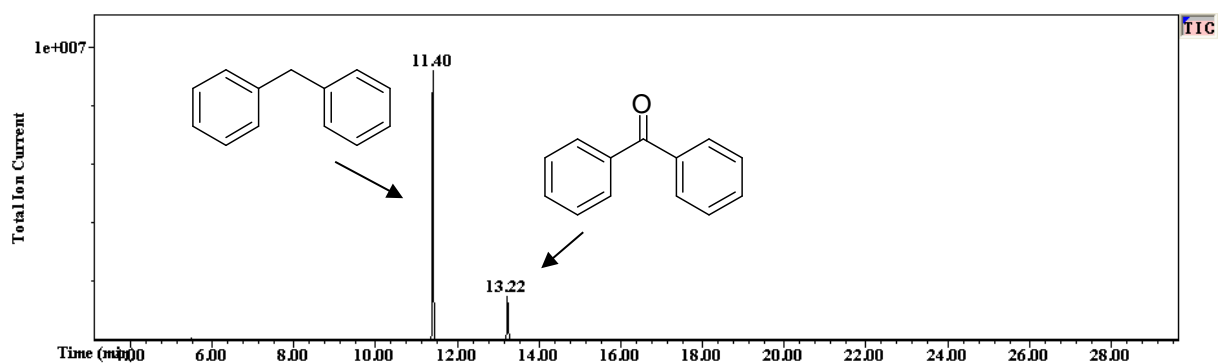
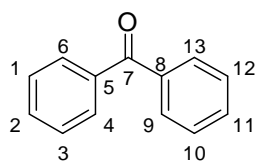


Abbildung 107: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von Diphenylmethan **61**.

Benzophenon 66

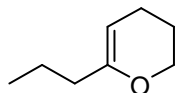


KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1615. (Literaturwert: 1625)²⁶³

GC-MS *m/z* (%): 182 (44, M⁺), 105 (100, M – 77), 77 (65, M – 105), 51 (35, M – 131).

Biotransformation von heterozyklischen Verbindungen

Biotransformation von 1-Propyl-3,4-dihydro-2H-pyran **75**



In einem 100 mL Rundkolben wurde abgekochtes Lyophilisat (600 mg, 2 h bei 100 °C) in Tris-HCl-Puffer (30 mL, 20 mM, pH = 7.5) suspendiert und mit 1-Propyl-3,4-dihydro-2H-pyran **75** (100 µL, 0,72 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 72 h bei RT und 900 rpm gerührt. Anschließend wurde dem Reaktionsgemisch Et₂O/Pentan (50 mL, v/v 1:1) zugesetzt und 10 min gerührt. Das Lyophilisat wurde mit Hilfe eines Büchnertrichters entfernt. Nach dem Trennen der Phasen wurde dreimal mit Et₂O/Pentan (50 mL, v/v 1:1) extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Der Extrakt wurde mittels Destillation an einer Vigreux-Kolonnen auf 1 mL eingengt. 1-Hydroxyoctan-5-on **76** (33 mg, 0,23 mmol, 33%) wurde als farbloses Öl erhalten.

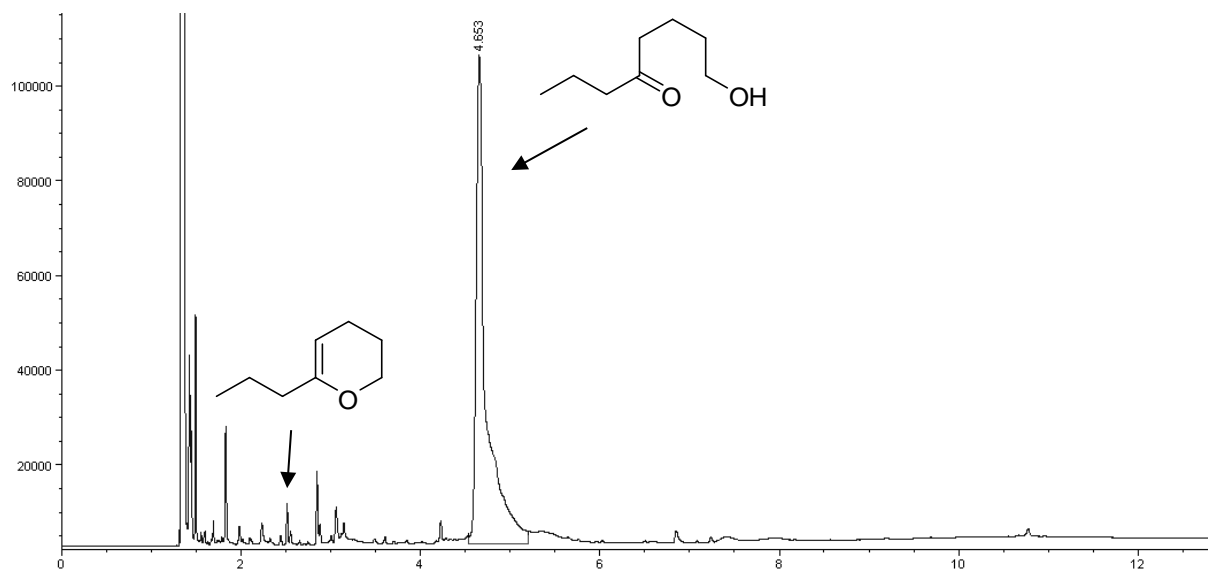
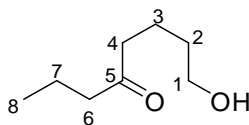


Abbildung 108: GC-FID-Chromatogramm der Biotransformation von 1-Propyl-3,4-dihydro-2H-pyran **75**.

1-Hydroxyoctan-5-on 76

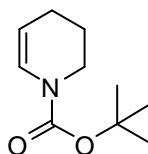
KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1265.

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_8H_{16}O_2$ $[M+Na]^+ = 167.1043$, gef. 167.1048.

GC-MS m/z (%): 126 (28, M - 18), 98 (39, M - 46), 83 (45, M - 61), 71 (100, M - 73), 55 (85, M - 89), 43 (92, M - 101).

1H -NMR (400 MHz, Aceton- d_6): δ [ppm] = 3.52 (t, 2H, $^3J = 6.36$ Hz, 1-H), 2.45 - 2.37 (m, 4H, 4-H, 6-H), 1.61 - 1.47 (m, 6H, 3-H, 2-H, 7-H), 0.89 - 0.85 (m, 3H, 8-H).

^{13}C -NMR (100 MHz, Aceton- d_6): δ [ppm] = 210.5 (C1), 62.1 (C5), 44.8 (C6), 42.8 (C2), 33.1 (C4), 20.9 (C3), 17.8 (C7), 14.0 (C8).

Biotransformation von *N*-Boc-4,5-Dihydropyridin 79

Die Biotransformation von *N*-Boc-4,5-Dihydropyridin **79** (100 μ L, 0,56 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Pentan/ Et_2O , v/v 1:2). Dabei wurde das Diol **81** (32 mg, 0,15 mmol, 26%) isoliert.

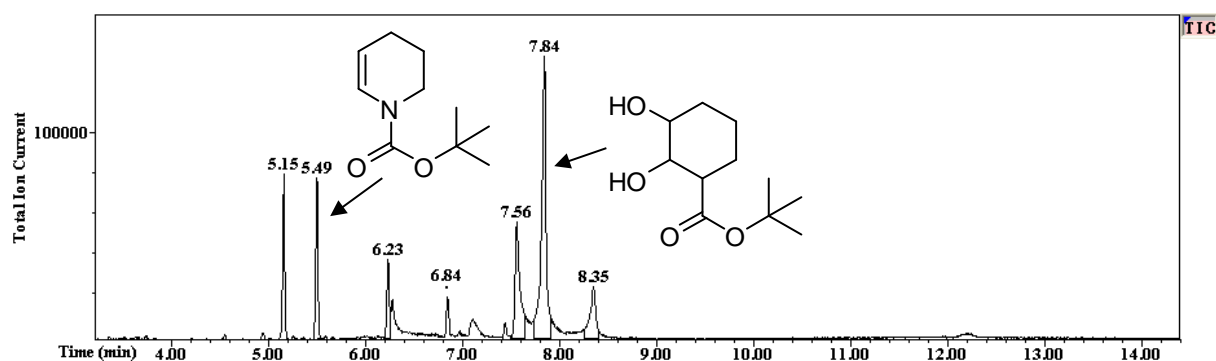
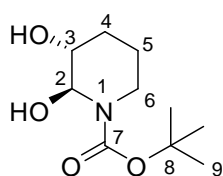


Abbildung 109: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von N-Boc-4,5-Dihydropyridin 79.

N-Boc-2,3-Dihydroxypiperidin 81



R_f - Wert = 0,1 (Pentan/ Et_2O , v/v 1:2, Molybdätposphorsäure).

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1614.

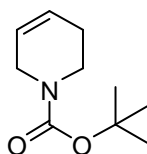
HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 240,1206$, gef. 240,1196.

GC-MS m/z (%): 142 (15 M - 75), 97 (8, M - 120), 70 (24, M - 147), 59 (33, M - 158), 57 (100, M - 160), 41 (36, M - 173).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.67 (d, 1H, $^3J = 3.66$ Hz, 2-H), 3.77 - 3.71 (m, 1H, 6-H), 3.63 - 3.59 (m, 1H, 3-H), 2.96 (dd, 1H, $^3J = 13.01$ Hz, $^2J = 2.93$ Hz, 6-H), 1.86 - 1.57 (m, 4H, 5-H, 4-H), 1.47 (s, 9H, 9-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 80.8 (C8), 69.2 (C3), 28.5 (C9), 27.2 (C4), 23.6 (C5).

Die beiden Kohlenstoffe in der Nachbarschaft zum Stickstoffatom zeigen keine Signale im ^{13}C -Spektrum. Lediglich die Korrelation mit den entsprechenden Protonen im HSQC-Spektrum deutet auf deren Existenz hin.

Biotransformation von *N*-Boc-5,6-Dihydropyridin **80**

Die Biotransformation von *N*-Boc-5,6-Dihydropyridin **80** (150 μ L, 0,84 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Pentan/ Et_2O , v/v 1:1), dabei wurde das Diol **83** (39 mg, 0,18 mmol, 21%) isoliert.

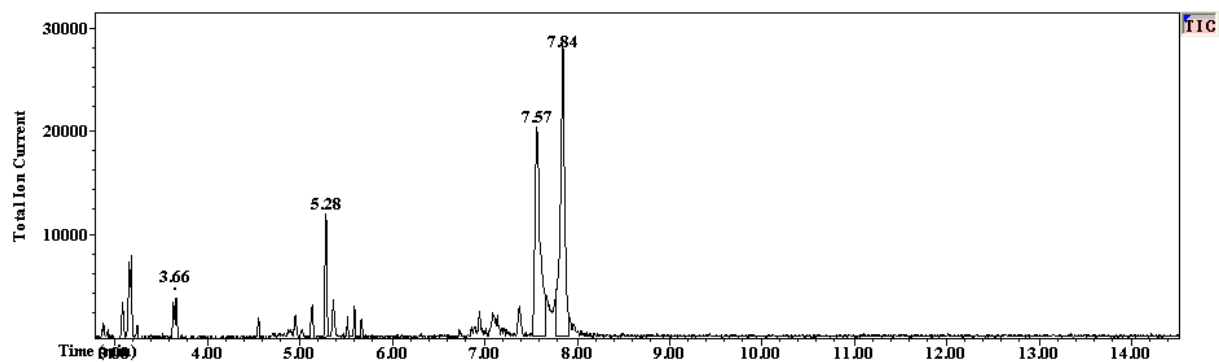
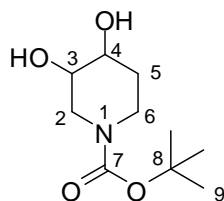


Abbildung 110: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von *N*-Boc-5,6-Dihydropyridin **80**.

N-Boc-3,4-Dihydroxypiperidin **83**

R_f - Wert = 0,2 (Pentan/ Et_2O , v/v 1:2, Molybdätposphorsäure).

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1612.

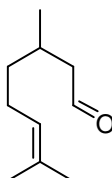
GC-MS m/z (%): 142 (16 M - 75), 70 (26, M - 147), 59 (36, M - 158), 57 (100, M - 160), 56 (23, M - 167), 41 (59, M - 173), 39 (27, M - 175).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.78 - 5.70 (m, 1H, 3-H), 3.90 - 8.89 (m, 5H, 2, 4, 6-H), 2.08 - 1.81 (m, 2H, 5 - H), 1.46 (s, 9H, 9-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 81.1 (C8), 72.7 (C3), 53.9 (C4), 28.5 (C9), 24.5 (C5).

Biotransformation von acyclischen Olefinen

Biotransformation von Citronellal **86**



In einem 100 mL Rundkolben wurde das Lyophilisat (600 mg) in Tris-HCl-Puffer (30 mL, 20 mM, pH = 7,5) suspendiert und mit Citronellal **86** (200 μ L, 1,13 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei RT und 900 rpm gerührt. Anschließend wurde dem Reaktionsgemisch Et₂O/Pentan (50 mL, v/v 1:1) zugesetzt und 10 min gerührt. Das Lyophilisat wurde mit Hilfe eines Büchnertrichters entfernt. Nach dem Trennen der Phasen wurde dreimal mit Et₂O/Pentan (50 mL, v/v 1:1) extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Der Extrakt wurde mittels Destillation an einer Vigreux-Kolonnen auf 1 mL eingengt und das erhaltene Produkt **87** (48 mg, 0,32 mmol, 29%) wurde gaschromatographisch gereinigt.

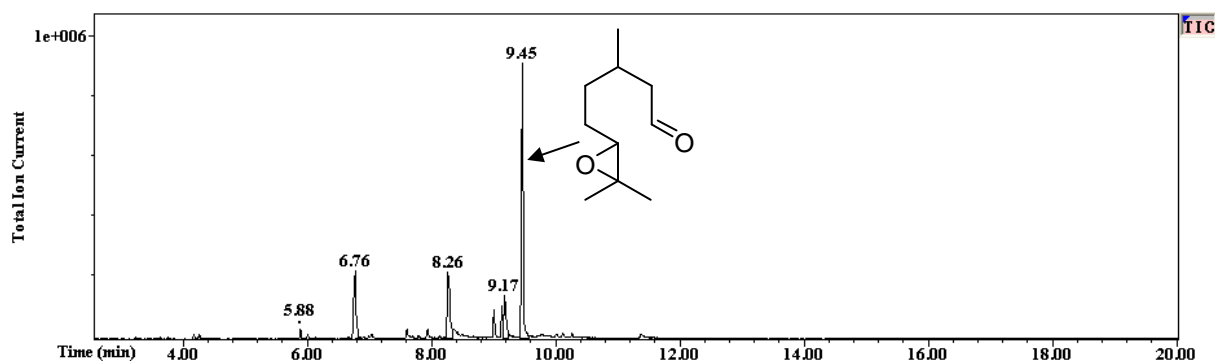
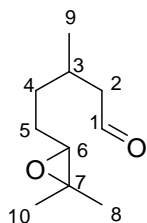


Abbildung 111: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von Citronellal **86**.

6,7-Epoxy-3,7-Dimethyloctanal **87**



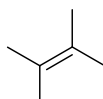
KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1289.

GC-MS m/z (%): 170 (2, M^+), 123 (11, $M - 47$), 109 (13, $M - 61$), 97 (36, $M - 73$), 85 (29, $M - 85$), 81 (52, $M - 89$), 71 (47, $M - 99$), 69 (42, $M - 101$), 59 (100, $M - 111$), 55 (73, $M - 115$).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2.70 (t, 1H, $^3J = 3.66$ Hz, 6-H), 2.45 - 2.40 (m, 1H, 2-H), 2.31 - 2.24 (m, 1H, 2-H), 2.16 - 2.09 (m, 1H, 3-H), 1.56 - 1.52 (m, 2H, 5-H), 1.47 - 1.42 (m, 2H, 4-H), 1.31 (s, 3H, 8-H/10-H), 1.26 (d, 3H, $^3J = 0.80$ Hz, 8-H/10-H), 0.99 (d, 3H, $^3J = 6.40$ Hz, 9-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 202.6, 202.5 (C1), 64.2 (C6), 58.3, 58.2 (C7), 50.9, 50.8 (C2), 33.5 (C4), 27.9 (C3), 26.4, 26.3 (C5), 24.8 (C8/C10), 19.9, 19.7 (C8/C10), 18.7, 18.6 (C9).

Biotransformation von 2,3-Dimethylpent-2-en 93



Die Biotransformation von 2,3-Dimethylpent-2-en **93** (200 μL , 0,84 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Pentan/ Et_2O , v/v 1:1), dabei wurde das Diol **94** (39 mg, 0,18 mmol, 21%) isoliert.

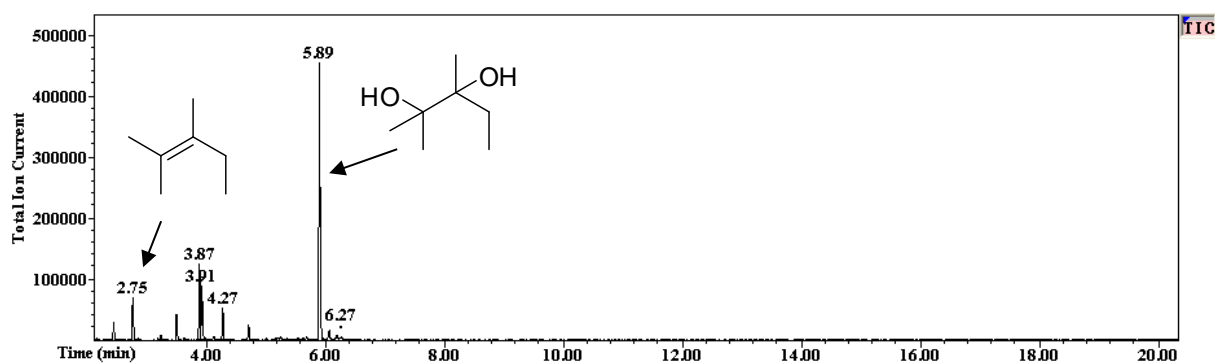
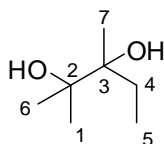


Abbildung 112: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von 2,3-Dimethylpent-2-en 93.

2,3 - Dimethyl-2,3-Pentandiol 94



R_f - Wert = 0,2 (Pentan/ Et_2O , v/v 1:1, Molybdatophosphorsäure).

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1012.

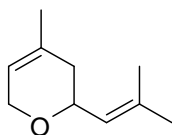
GC-MS m/z (%): 117 (2, M - 15), 103 (5, M - 29), 99 (8, M - 33), 85 (23, M - 47), 73 (100, M - 59), 59 (54, M - 73), 57 (22, M - 71), 55 (27, M - 77), 43 (62, M - 89).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2.00 (bs, 1H, OH), 1.79 (bs, 1H, OH), 1.70 - 1.64 (m, 1H, 4-H), 1.49 - 1.41 (m, 1H, 4-H), 1.23 (s, 3H, 1-H/6-H), 1.21 (s, 3H, 1-H/6-H), 1.14 (s, 3H, 7-H), 0.97 (t, 3H, 3J = 7.41 Hz, 5-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 77.4 (C3), 75.6 (C2), 28.5 (C4), 25.2 (C1/C6), 24.8 (C1/C6), 20.4 (C7), 8.2 (C5).

Biotransformationen im Rahmen der organischen Synthese

Biotransformation von Neroloxid 101



Die Biotransformation von Neroloxid **101** (40 μ L, 0,25 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$, v/v 10:1). Es konnten zwei Substanzen isoliert werden. Substanz **102** (18 mg, 0,11 mmol, 9%) und Substanz **103** (20 mg, 0,12 mmol, 10%).

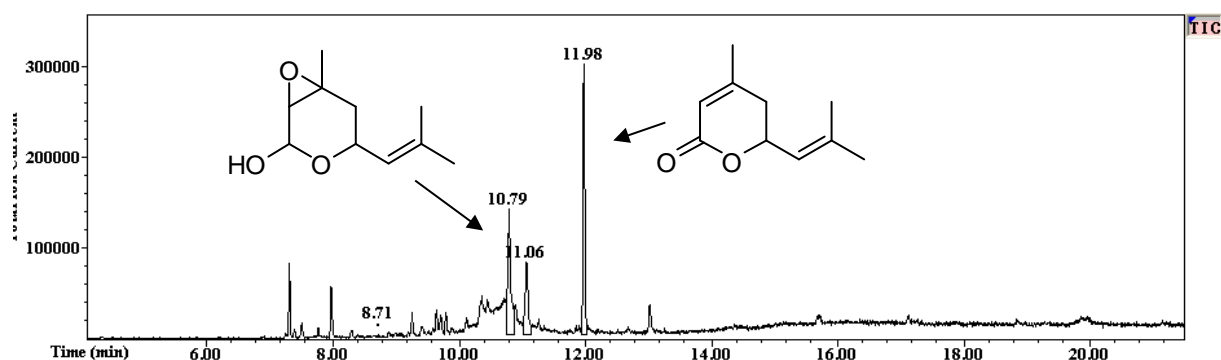
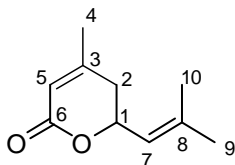


Abbildung 113: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von Neroloxid 101.

Neroloxid-Lacton 102



R_f - Wert = 0,6 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$, v/v 10:1, Molybdatophosphorsäure).

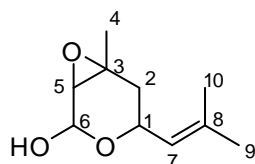
KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1535.

GC-MS m/z (%): 166 (3, M^+), 151 (7, $\text{M} - \text{CH}_3$), 124 (16, $\text{M} - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}$), 91 (5, $\text{M} - 75$), 82 (100, $\text{M} - 84$), 67 (11, $\text{M} - 99$), 54 (19, $\text{M} - 112$).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.82 (s, 1H, 5-H), 5.33-5.33 (m, 1H, 7-H), 5.12-5.06 (m, 1H, 1-H), 2.37-2.23 (m, 2H, 2-H), 1.98 (s, 3H, 4-H), 1.76-1.76 (m, 3H, 9-H/10-H), 1.72-1.72 (m, 3H, 9-H/10-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 165.3 (C6), 157.0 (C3), 139.4 (C8), 122.1 (C7), 116.7 (C5), 74.2 (C1), 35.1 (C2), 25.7 (C9), 23.0 (C4), 18.4 (C10).

Neroloxid-Epoxid 103



R_f - Wert = 0,2 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$, v/v 10:1, Molybdatophosphorsäure).

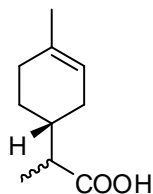
KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1402.

GC-MS m/z (%): 136 (15, M - 49), 123 (9, M - 61), 109 (9, M - 75), 98 (14, M - 86), 95 (16, M - 89), 93 (10, M - 91), 91 (20, M - 93), 85 (34, M - 99), 83 (100, M - 101), 82 (11, M - 102), 79 (13, M - 105), 77 (15, M - 107), 71 (13, M - 113), 69 (15, M - 115), 67 (27, M - 117), 60 (28, M - 124), 57 (11, M - 127), 56 (11, M - 128), 55 (39, M - 129).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.32 (s, 1H, 5-H), 5.11-5.08 (m, 1H, 7-H), 4.44-4.39 (m, 1H, 1-H), 3.25 (d, 1H, $^3J = 3.3$ Hz, 6-H), 1.91-1.87 (m, 2H, 2-H), 1.72-1.72 (m, 3H, 10-H), 1.68-1.67 (m, 3H, 9-H), 1.43 (s, 3H, 4-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 137.6 (C8), 123.8 (C7), 88.3 (C5), 61.8 (C1), 60.2 (C3), 59.3 (C6), 35.7 (C2), 25.7 (C9), 21.9 (C4), 18.3 (C10).

Biotransformation von Dimethylcyclohexenylpropansäure **109**



Die Biotransformation des Substrates **109** (82 μ L, 0,55 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. Das Weinlacton **104** konnte anhand der Massenspektren, und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten, identifiziert werden. Die prozentuale Umsetzungsrate betrug 90%.

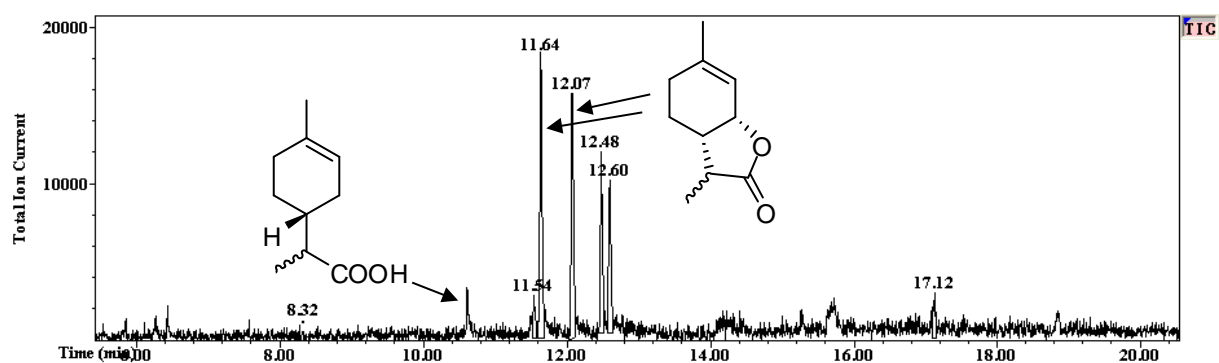
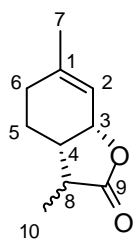


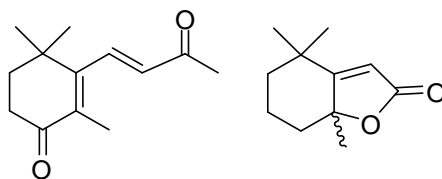
Abbildung 114: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation der Carbonsäure **109**.

Weinlacton **104**



KI (HP-5, Temperaturprogramm): 2097, 2141.

GC-MS m/z (%): 166 (23, M^+), 151 (100, $M - 15$), 138 (10, $M - 28$), 123 (15, $M - 43$), 107 (37, $M - 59$), 93 (79, $M - 73$), 91 (50, $M - 75$), 79 (52, $M - 87$), 77 (32, $M - 89$), 55 (47, $M - 111$).

Synthese von 3-Oxo- β -Ionon **110**; Dihydroactinidiolid **111**

Die Biotransformation von β -Ionon **26** (40 μ L, 0,63 mmol) wurde nach **AV 1** durchgeführt. Die Biotransformation wurde mittels DC-Analytik auf ihre Vollständigkeit kontrolliert. Anschließend wurde das gesamte Reaktionsgemisch für 24 h bei 100 °C erhitzt. 3-Oxo- β -Ionon **110** und Dihydroactinidiolid **111** wurden anhand der Massenspektren und durch den Vergleich der ermittelten Kovats-Indizes mit den Literaturdaten identifiziert. Die prozentuale Umsetzungsrate betrug 99%.

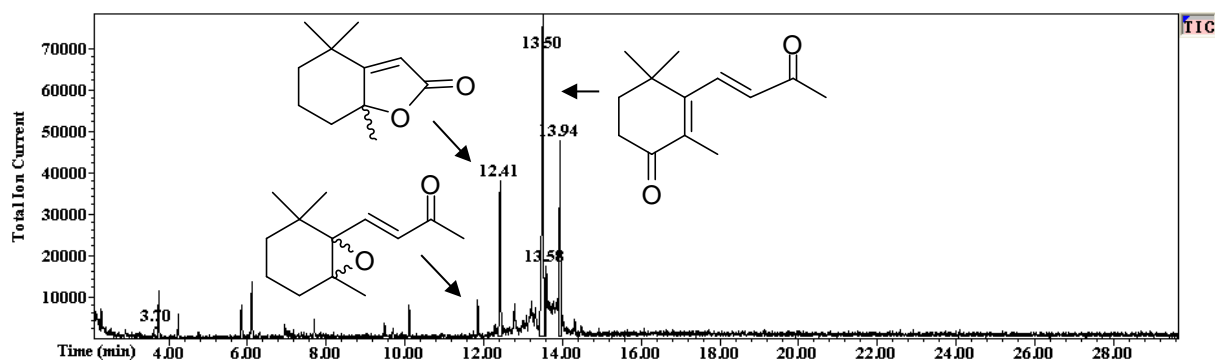
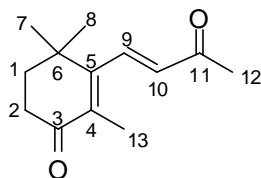
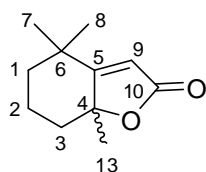


Abbildung 115: GC-MS-Chromatogramm der Synthese des α,β -ungesättigte Carbonyls **110** und des Dihydroactinidiolides **111** aus β -Ionon **26**.

3-Oxo- β -Ionon **110**

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1711.

GC-MS m/z (%): 206 (54, M^+), 163 (100, $M - 43$), 150 (31, $M - 56$), 149 (25, $M - 57$), 135 (37, $M - 71$), 121 (63, $M - 85$), 107 (32, $M - 99$), 105 (30, $M - 101$), 93 (33, $M - 113$), 91 (55, $M - 115$), 79 (36, $M - 127$), 77 (34, $M - 129$), 65 (28, $M - 141$), 55 (41, $M - 151$).

Dihydroactinidiolid 111



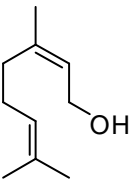

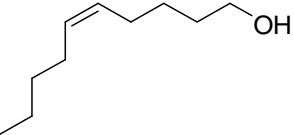
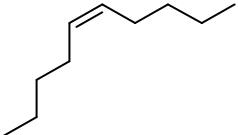
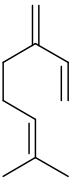

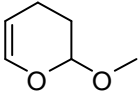
KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1614.

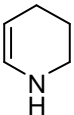
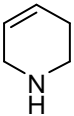
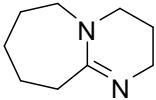
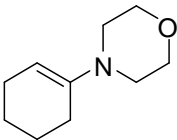
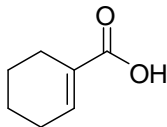
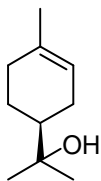
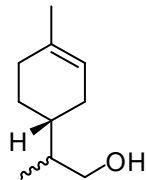
GC-MS m/z (%): 180 (23, M^+), 152 (10, $M - 18$), 137 (33, $M - 43$), 124 (13, $M - 56$), 123 (11, $M - 57$), 111 (100, $M - 69$), 110 (27, $M - 70$), 109 (48, $M - 71$), 95 (21, $M - 85$), 81 (17, $M - 99$), 67 (41, $M - 103$).

Nicht-umgesetzte Verbindungen

Die Biotransformationen wurden nach **AV 1** durchgeführt.

Tabelle 6: Verbindungen, welche durch das Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* nicht umgesetzt werden konnten.

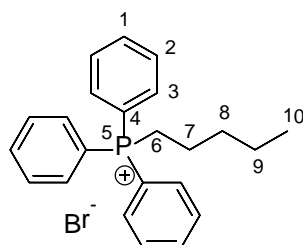
Name	Strukturformel	Ansatzgröße
Cyclopenten 20		22 µL, 0,25 mmol
Adamantan 112		55 mg, 0,41 mmol
Nerol 113		88 µL, 0,54 mmol
<i>trans</i> -Dec-5-en 88		47 µL, 0,25 mmol
<i>cis</i> -Dec-5-en-1-ol 114		50 µL, 0,27 mmol
<i>cis</i> -Dec-5-en 92		50 µL, 0,27 mmol
Myrcen 95		85 µL, 0,52 mmol
3,4-Dihydropyran 72		50 µL, 0,55 mmol
Methoxypyran 73		50 µL, 0,45 mmol

1,2,3,4-Tetrahydropyridin 84		100 μ L, 1,05 mmol
1,2,3,6-Tetrahydropyridin 85		100 μ L, 1,05 mmol
Diazobocycloundecen 115		100 μ L, 0,65 mmol
Morpholinocyclohexen 116		50 μ L, 0,31 mmol
1-Cyclohexen-1-Carbonsäure 117		30 μ L, 0,27 mmol
α -Terpineol 118		41 μ L, 0,25 mmol
2-(4-Methylcyclohexen-3-enyl)-propan-1-ol 108		85 μ L, 0,50 mmol

Darstellung von nicht käuflich erhältlichen Substraten

Sofern erforderlich wurden die Reaktionen mit Argon 5.0 der Firma Air Liquide oder Stickstoff als Schutzgas unter Verwendung der Schlencktechnik in absoluten Lösungsmitteln durchgeführt. Die getrockneten Lösungsmittel wurden entweder nach Standardvorschriften gewonnen oder einer Lösungsmitteltrocknungsanlage MBraun MB-SPS 800 entnommen. Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Acros Organics, Alfa Aesar und VWR bezogen.

Pentyltriphenylphosphoniumbromid **91**²⁶⁴

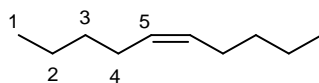


Triphenylphosphin (5,11 g, 19,5 mmol) wurde in abs. MeCN (20 mL) gelöst. Anschließend wurde 1-Brompentan (2,93 g, 19,5 mmol), gelöst in abs. MeCN (20 mL), langsam hinzu getropft und 48 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem destillativen Entfernen des Lösungsmittels wurde Toluol (20 mL) zugegeben und nochmals 30 min unter Rückfluss erhitzt. Toluol wurde abdekantiert und das Rohprodukt mit Et₂O gewaschen. Das Produkt **91** (4,91 g, 11,9 mmol, 62%) wurde als ein weißer, flockiger Niederschlag erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.79 - 7.64 (m, 15H, 1-H, 2-H, 3-H), 3.66 - 3.59 (m, 2H, 6-H), 1.58 - 1.55 (m, 4H, 7-H, 8-H), 1.25 - 1.24 (m, 2H, 9-H), 0.75 (t, 3H, ³J = 7.3 Hz, 10-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 135.1, 135.0 (C1), 133.6, 133.5 (C3), 130.6, 130.4 (C2), 118.6, 117.8 (C4), 32.4, 32.3 (C6), 23.0, 22.5, (C7), 22.2, 22.2 (C8), 22.1 (C9), 13.6 (C10).

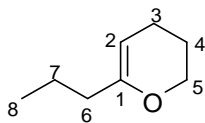
³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 24.17.

***cis*-Decen **92**²³²**

Ein Reaktionsgemisch aus Pentyltriphenylphosphoniumbromid **91** (1,50 g, 3,51 mmol), Natriumamid (0,27 g, 3,51 mmol) und Kalium *tert*-butoxid (0,04 g, 0,32 mmol) in abs. Et₂O (70 mL) wurde 2h bei RT gerührt. Anschließend wurde bei -78 °C Pentanal (0,34 mL, 3,51 mmol) innerhalb von 20 min zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht auf RT erwärmt und mit Wasser (30 mL) versetzt. Danach wurde dreimal mit Et₂O extrahiert, die vereinigten, organischen Phasen wurden im Vakuum eingeeengt und der Rückstand wurde in Hexan (100 mL) aufgenommen. Das ausgefallene Triphenylphosphanoxid wurde abfiltriert und das Hexan unter vermindertem Druck entfernt. *cis*-Decen **92** (0,40 g, 2,79 mmol, 81%) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.35 (t, 2H, ³*J* = 4.5 Hz, 5-H), 2.03 (q, 4H, ³*J* = 5.1 Hz, 4-H), 1.37 - 1.28 (m, 8H, 3-H, 2-H), 0.93 - 0.86 (m, 6H, 1-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 130.0 (C5), 32.1 (C4), 27.1 (C3), 22.5 (C2), 14.2 (C1).

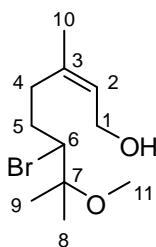
1-Propyl-3,4-dihydro-2H-pyran 75²²⁷

3,4-Dihydro-2H-pyran **72** (0,90 mL, 10,1 mmol) wurde in abs. THF gelöst und bei -78 °C langsam mit *sec*-BuLi (7,90 mL, 1,4 M in Cyclohexan, 11,0 mmol) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei -5 °C gerührt und anschließend wieder auf -78 °C gekühlt. Nach der Zugabe von 1-Iodpropan (1,00 mL, 10,0 mmol) wurde das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt und mit ges. wässriger NH₄Cl gequencht. Danach wurde dreimal mit Et₂O extrahiert, zweimal mit H₂O gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt mit Hilfe der präparativen GC gereinigt. 1-Propyl-3,4-dihydro-2H-pyran **75** (1,02 g, 8,10 mmol, 81%) wurde als eine farblose Flüssigkeit erhalten.

GC-MS *m/z* (%): 126 (44, M⁺), 111 (19, M - CH₃), 98 (100, M - 28), 83 (46, M - 43), 55 (77, M - 71), 43 (34, M - 83).

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-*d*₆): δ [ppm] = 4.46 (t, 1H, ³*J* = 3.6 Hz, 2-H), 3.97 (t, 2H, ³*J* = 5.2 Hz, 5-H), 2.00-1.97 (m, 2H, 3-H), 1.95 (t, 2H, ³*J* = 7.5 Hz, 6-H), 1.80 - 1.76 (m, 2H, 4-H), 1.46 (sxt, 2H, ³*J* = 7.4 Hz, 7-H), 0.89 (t, 3H, ³*J* = 7.4 Hz, 8-H).

¹³C-NMR (100 MHz, Aceton-*d*₆): δ [ppm] = 154.5 (C1), 95.3 (C2), 66.2 (C5), 36.5 (C6), 22.7 (C3), 20.4 (C4), 20.4 (C7), 13.8 (C8).

6-Brom-3,7-dimethyl-7-methoxyoct-2-en-1-ol ⁹⁹²⁴²

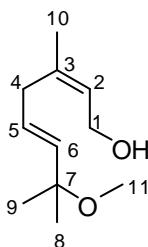
In einem mit Stickstoff gefluteten Dreihalskolben wurde Nerol **98** (10,0 g, 65,0 mmol) in abs. Methanol (90 mL) vorgelegt und im Eisbad gekühlt. Sobald die Lösung eine Temperatur von 5 °C erreicht hatte, wurde sie innerhalb von 30 min mit DDH (10,1 g, 35,1 mmol) versetzt. Bei der Zugabe wurde darauf geachtet, dass die Temperatur nicht über 10 °C anstieg. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch auf Eiswasser gegossen und dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zunächst dreimal mit ges. wässriger Na₂CO₃-Lösung (50 mL) und anschließend dreimal mit H₂O gewaschen. Der Extrakt wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel danach im Vakuum abdestilliert. Das Produkt **99** (15,5 g, 59,2 mmol, 77%) wurde in Form eines farblosen Öls erhalten.

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1665.

GC-MS *m/z* (%): 135 (24, M - 130), 107 (6, M - 158), 95 (8, M - 170), 93 (12, M - 172), 85 (12, M - 180), 81 (9, M - 184), 73 (100, M - 192), 69 (20, M - 196), 67 (8, M - 198), 55 (15, M - 210).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.51 (t, 1H, ³*J* = 14.8 Hz, 2-H), 3.88 (d, 1H, ³*J* = 11.4 Hz, 6-H), 3.21 (s, 3H, 11-H), 2.37-2.30 (m, 2H, 4-H), 2.18-2.10 (m, 2H, 5-H), 1.75 (s, 3H, 10-H), 1.32 (s, 3H, 9-H), 1.27 (s, 3H, 8-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 138.4 (C2), 126.1 (C3), 63.5 (C6), 59.2 (C1), 49.9 (C11), 31.6 (C5), 30.4 (C4), 23.7 (C9), 23.4 (C10), 21.5 (C8).

3,7-Dimethyl-7-methoxyocta-2,5-dien-1-ol 100^{242} 

6-Brom-3,7-dimethyl-7-methoxyoct-2-en-1-ol **99** (10,0 g, 38.1 mmol) und KOH (5,06 g) wurden in Methanol (30 mL) gelöst und für neun Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde das Gemisch im Vakuum eingedunstet und anschließend auf kaltes Wasser (150 mL) gegossen. Die Suspension wurde dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit H_2O gewaschen. Der Extrakt wurde über Mg_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$, v/v 3:1). Das Dien **100** (2,45 g, 13,3 mmol, 38%) wurde als gelbes Öl erhalten.

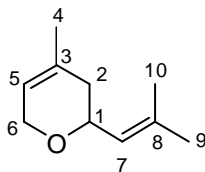
R_f - Wert = 0,3 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$, v/v 3:1, Molybdätdiäthylphosphorsäure).

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1380.

GC-MS m/z (%): 151 (21, M - 33), 134 (30, M - 50), 119 (80, M - 65), 105 (20, M - 79), 99 (36, M - 85), 93 (34, M - 91), 91 (81, M - 93), 85 (70, M - 99), 84 (32, M - 100), 83 (100, M - 101), 79 (42, M - 105), 77 (39, M - 107), 73 (33, M - 111), 69 (43, M - 115), 68 (92, M - 116), 67 (87, M - 117), 65 (21, M - 119), 59 (34, M - 125), 55 (49, M - 129), 53 (43, M - 131).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.49-5.45 (m, 2H, 3-H, 5-H, 6-H), 4.13 (d, 2H, $^3J = 6.9$ Hz, 1-H), 3.12 (s, 3H, 11-H), 2.80 (d, 2H, $^3J = 4.7$ Hz, 4-H), 1.72 (s, 3H, 10-H), 1.23 (s, 6H, 8-H, 9-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 138.1 (C2), 127.3 (C5), 125.1 (C6), 74.9 (C7), 59.1 (C1), 50.4 (C11), 35.2 (C4), 25.9 (C8, C9), 23.6 (C10).

Neroloxid 101²⁴²

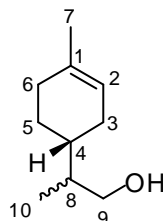
3,7-Dimethyl-7-methoxyocta-2,5-dien-1-ol **100** (400 mg, 2,17 mmol) wurden in Hexan (3 mL) gelöst. Das Gemisch wurde auf 0 °C im Eisbad gekühlt. Dann wurde 1,4 M, wässrige HCl (500 µL) hinzugegeben und für 2 h bei 0 °C stark gerührt. Nach dem Rühren hatten sich zwei Phasen gebildet. Die wässrige Phase wurde verworfen und die organische Phase wurde dreimal mit jeweils 0,6 M, wässriger NaHCO₃-Lösung (10 mL) gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase dreimal mit H₂O neutral gewaschen und über Mg₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und Neroloxid **101** (300 mg, 1,97 mmol, 91%) als gelbes Öl isoliert.

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1165.

GC-MS *m/z* (%): 152 (4, M⁺), 85 (25, M - 67), 83 (69, M - 69), 68 (100, M - 84), 67 (82, M - 85).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.40 (m, 1H, 5-H), 5.21 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz, 7-H), 4.22-4.17 (m, 3H, 1-H, 6-H), 2.07-2.00 (m, 2H, 2-H), 1.74 (s, 3H, 4-H), 1.69 (s, 6H, 9-H, 10-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 136.2 (C8), 132.0 (C3), 125.8 (C7), 119.8 (C5), 70.8 (C1), 65.7 (C6), 36.1 (C2), 25.9 (C9), 23.1 (C4), 18.5 (C10).

Menth-1-en-9-ol 108²⁴⁷

(+)-Limonen **33** (2,70 g, 0,02 mol) wurde unter Stickstoffatmosphäre mit einer Lösung aus 0.5 M 9 BBN in THF (40 mL, 0,02 mol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 12 h gerührt. Anschließend wurden EtOH (12 mL), 6 M NaOH (4 mL) und H₂O₂ (8 mL) vorsichtig hinzugegeben und 2 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT, wurde das Reaktionsgemisch mit Na₂CO₃ gesättigt und mit H₂O (80 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde daraufhin dreimal mit Et₂O (100 mL) extrahiert. Im Folgenden wurden die vereinten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Pentan/Et₂O, v/v 1:1). Der primäre Alkohol **108** (2,21 g, 14,3 mmol, 72%) wurde als ein Diastereomergemisch (1:1) isoliert. Das erhaltene Produkt war ein farbloses Öl.

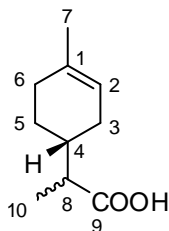
R_f - Wert = 0,2 (Pentan/Et₂O, v/v 1:1, Molybdatophosphorsäure).

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1892.

GC-MS *m/z* (%): 154(17, M⁺), 136 (14, M - 18), 121 (43, M - 33), 107 (39, M - 47), 94 (100, M - 60), 93 (74, M - 61), 79 (69, M - 75), 68 (47, M - 86), 67 (65, M - 87), 55(38, M - 99).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.35-5.36 (m, 1H, 9-H), 3.61-3.66 (m, 1H, 9-H), 3.44-3.49 (m, 1H, 8-H), 1.68-2.08 (m, 6H, 3-H, 5-H, 6-H), 1.62 (s, 3H, 7-H), 1.48-1.60 (m, 2H, 4-H, 2-H), 0.85-0.93 (m, 3H, 10-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 134.1, 134.2 (C1), 120.8, 120.8 (C2), 66.4, 66.5 (C9), 40.1, 40.3 (C8), 35.2, 35.4 (C4), 30.7, 30.9 (C3/C6), 27.8, 29.9 (C3/C6), 25.6, 27.3 (C5), 23.6 (C7), 13.3, 13.8 (C10).

Dimethylcyclohexenylpropansäure **109**²⁴⁷

Der primäre Alkohol **108** (1,53 g, 9,93 mmol) wurde mit in DMF (20 mL) gelöstem PDC (13,1 g, 34,9 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Stickstoffatmosphäre 19 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser (200 mL) gestoppt und die wässrige Phase wurde zweimal mit Et₂O (100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit einer 0,5 M wässrigen Na₂CO₃-Lösung (100 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde anschließend mit 0,1 M HCl angesäuert und erneut zweimal mit Et₂O (100 mL) extrahiert. Im Anschluss daran wurden die vereinigten organischen Phasen mit 0,1 M HCl (100 mL) und gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Carbonsäure **109** (0,68 g, 4,05 mmol, 40%) wurde als Diastereomerengemisch (1:1) isoliert. Das erhaltene Produkt war ein klares, farbloses Öl.

KI (HP-5, Temperaturprogramm): 1452.

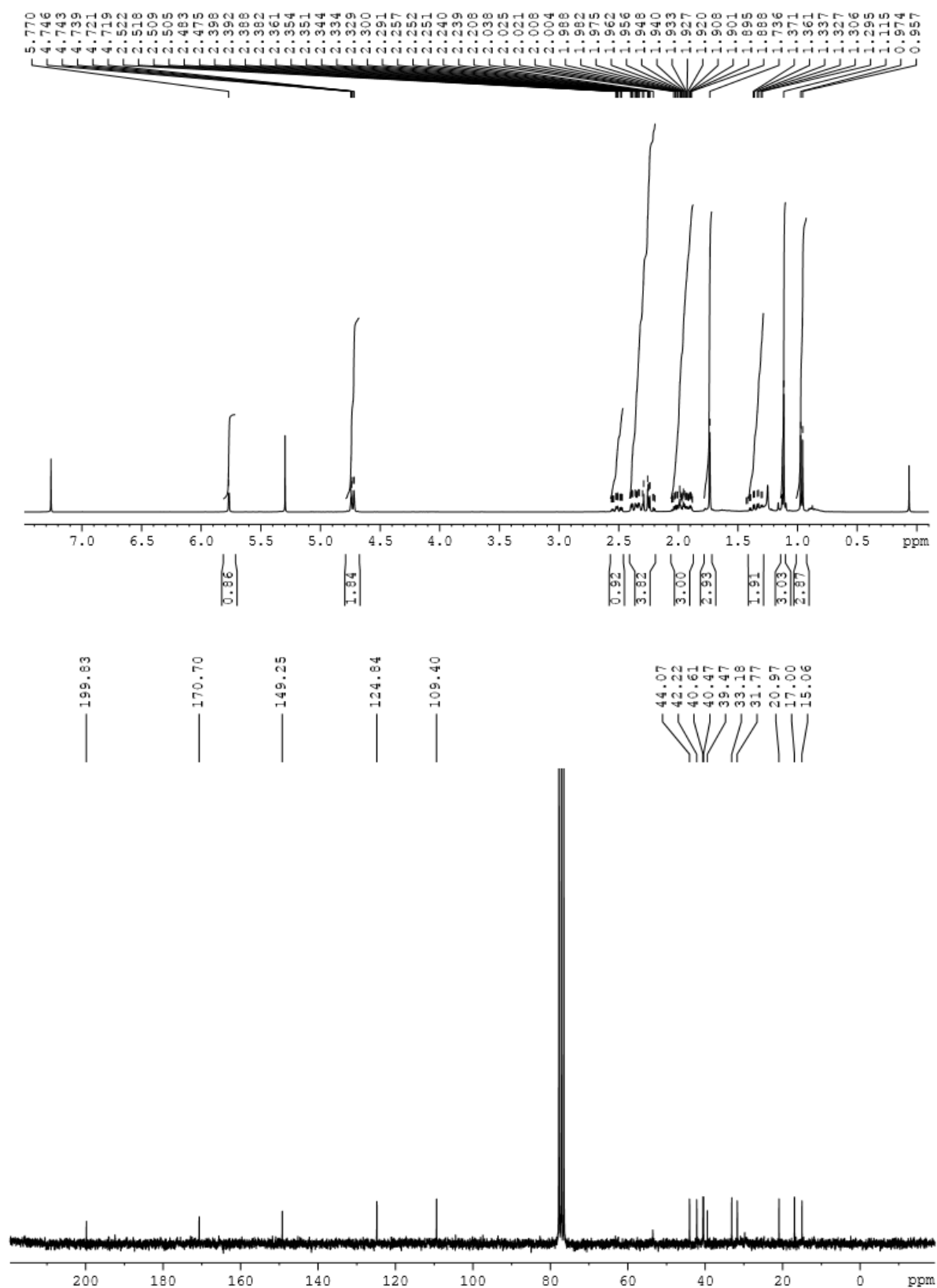
GC-MS *m/z* (%): 168 (4, M⁺), 150 (5, M - 18), 94 (100, M - 68), 93 (9, M - 75), 79 (51, M - 89), 74 (6, M - 94), 67 (20, M - 101), 55 (11, M - 113).

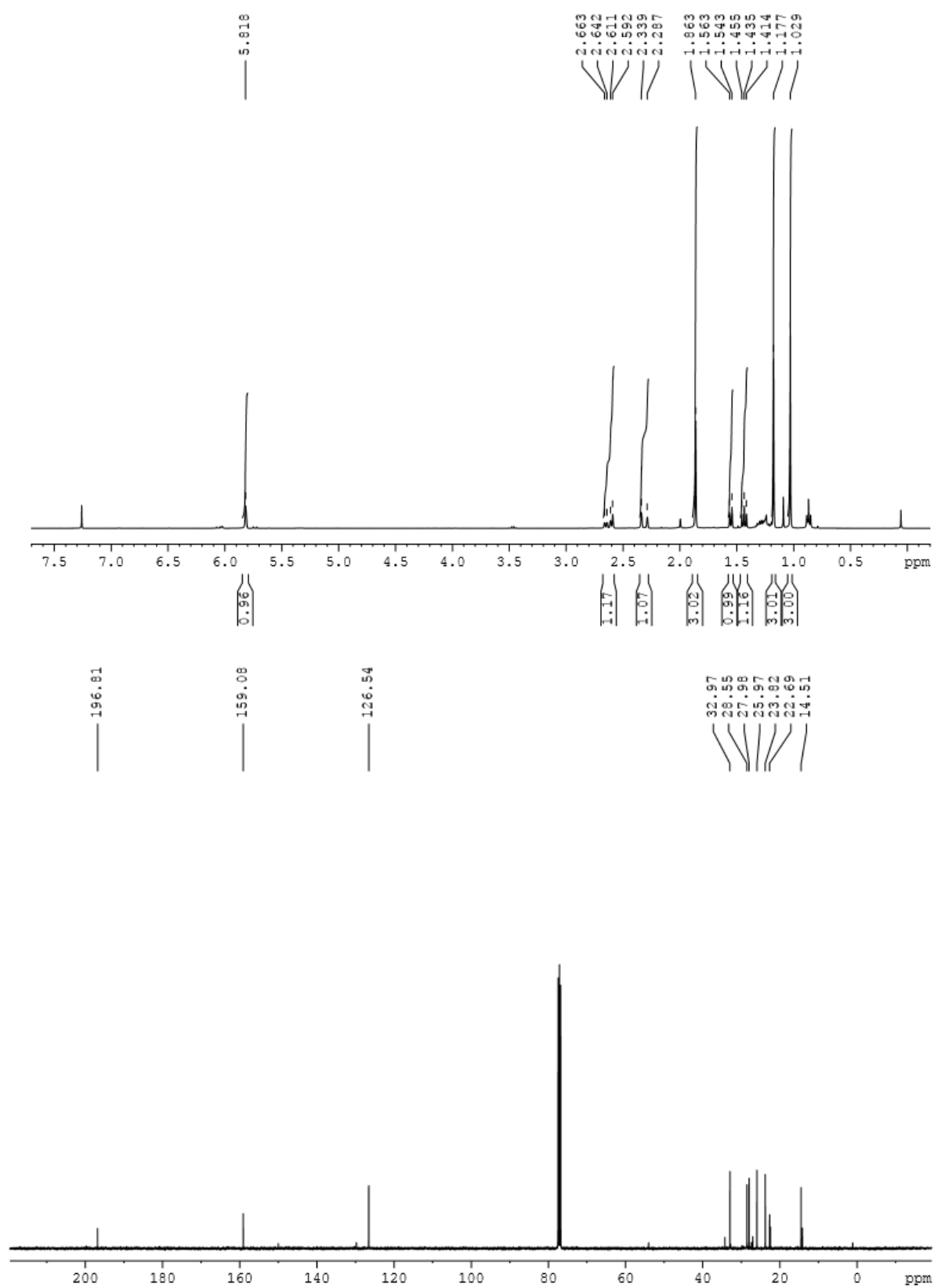
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.35 (m, 1H, 2-H), 2.37-2.31 (m, 1H, 8-H), 2.07-1.91 (m, 4H, 3-H, 6-H), 1.83 - 1.71 (m, 3H, 4-H, 5-H), 1.63 (s, 3H, 7-H), 1.22 (m, 3H, 10-H).

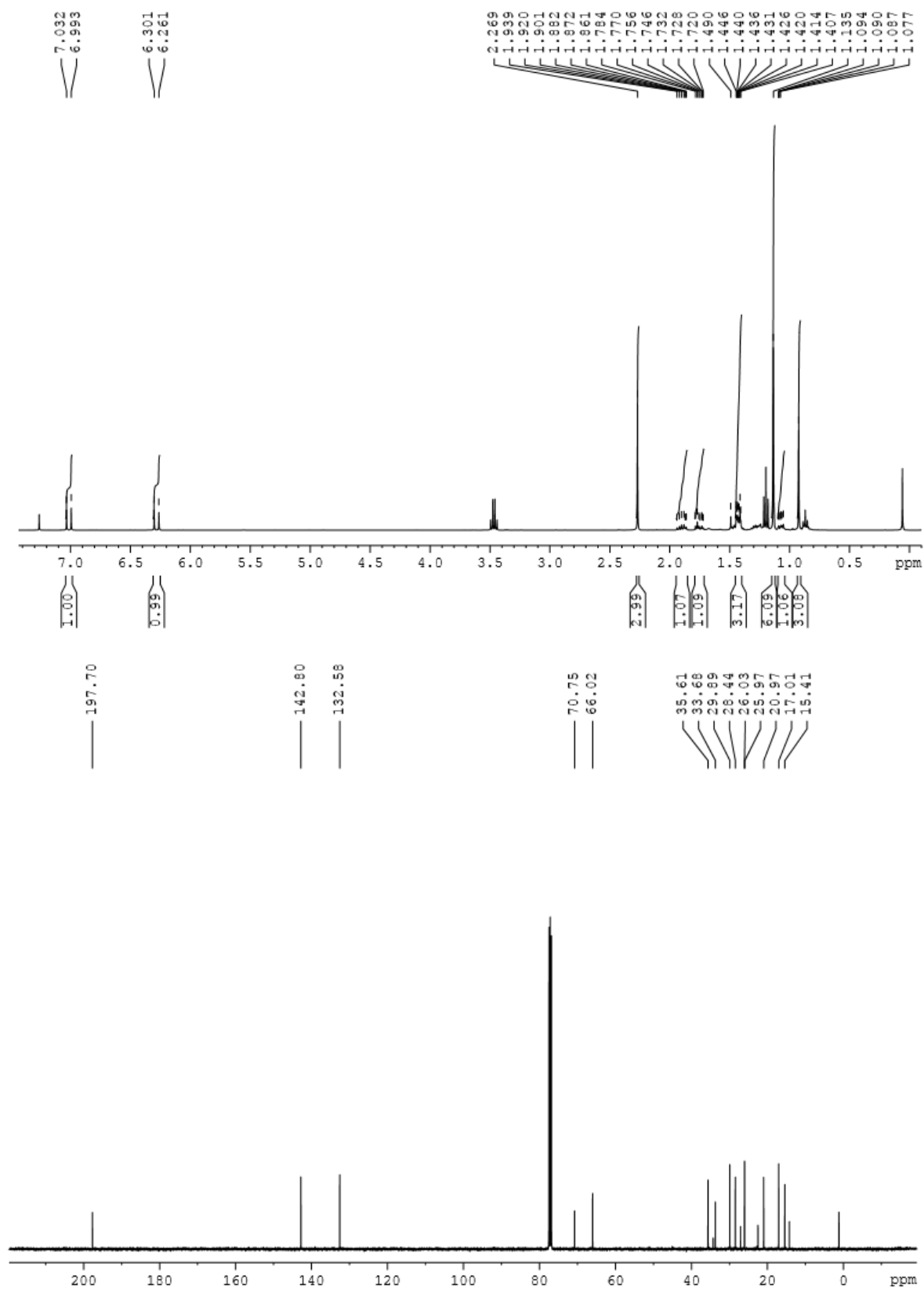
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 182.7, 182.7 (C9), 134.2, 134.0 (C1), 120.1, 120.0 (C2), 44.8, 44.2 (C8), 36.5 (C4), 30.1, 29.8 (C3/C6), 28.6, 27.6 (C3/C6), 26.4, 25.8 (C5), 23.6 (C7), 14.1, 14.0 (C10).

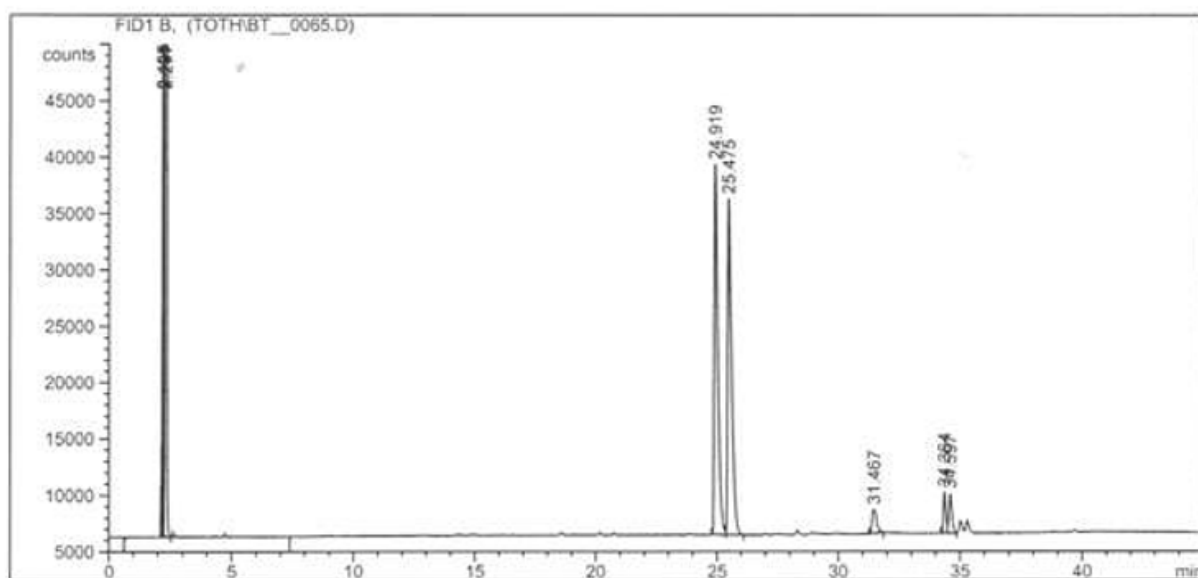
Anhang

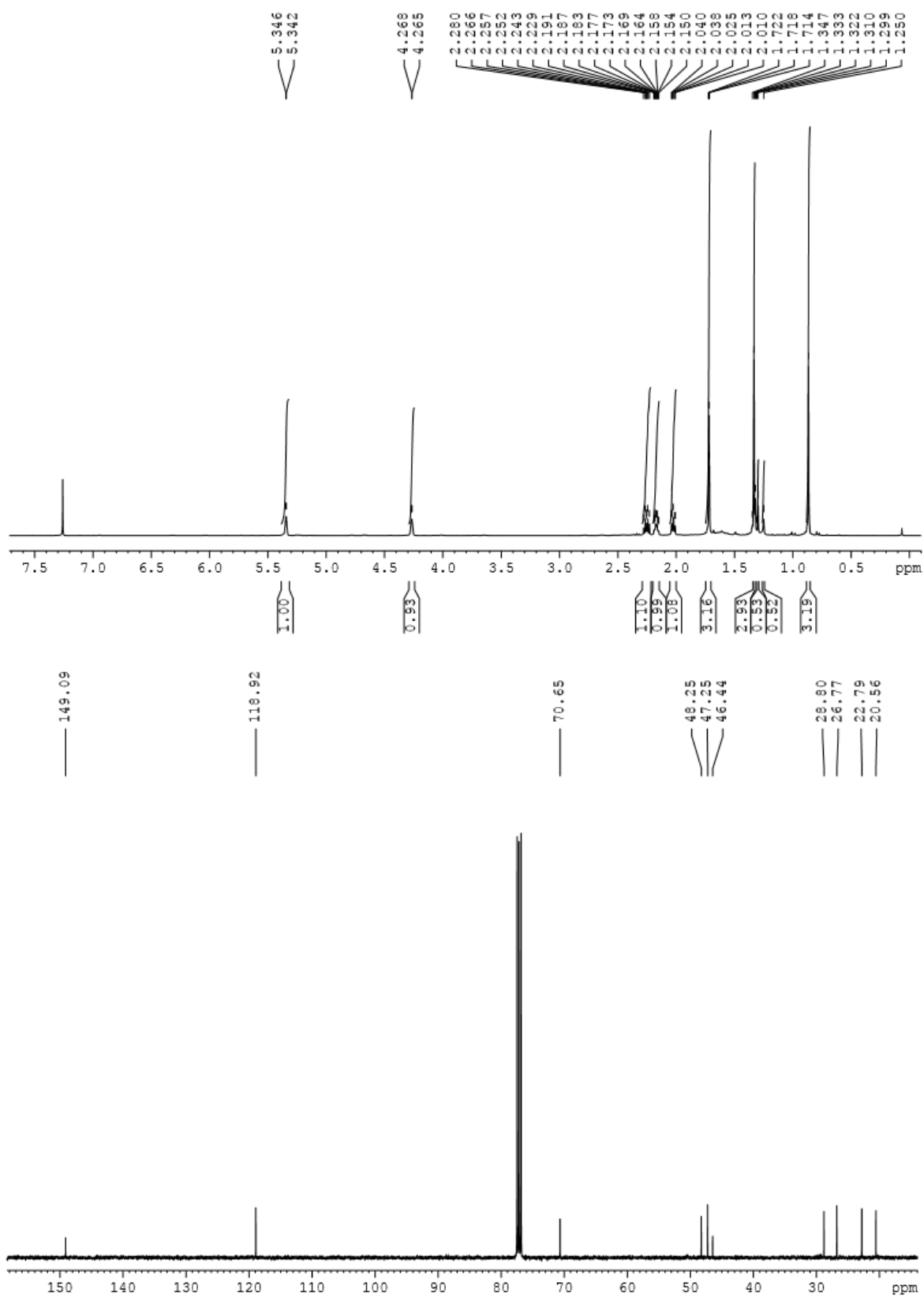
Nootkaton 15

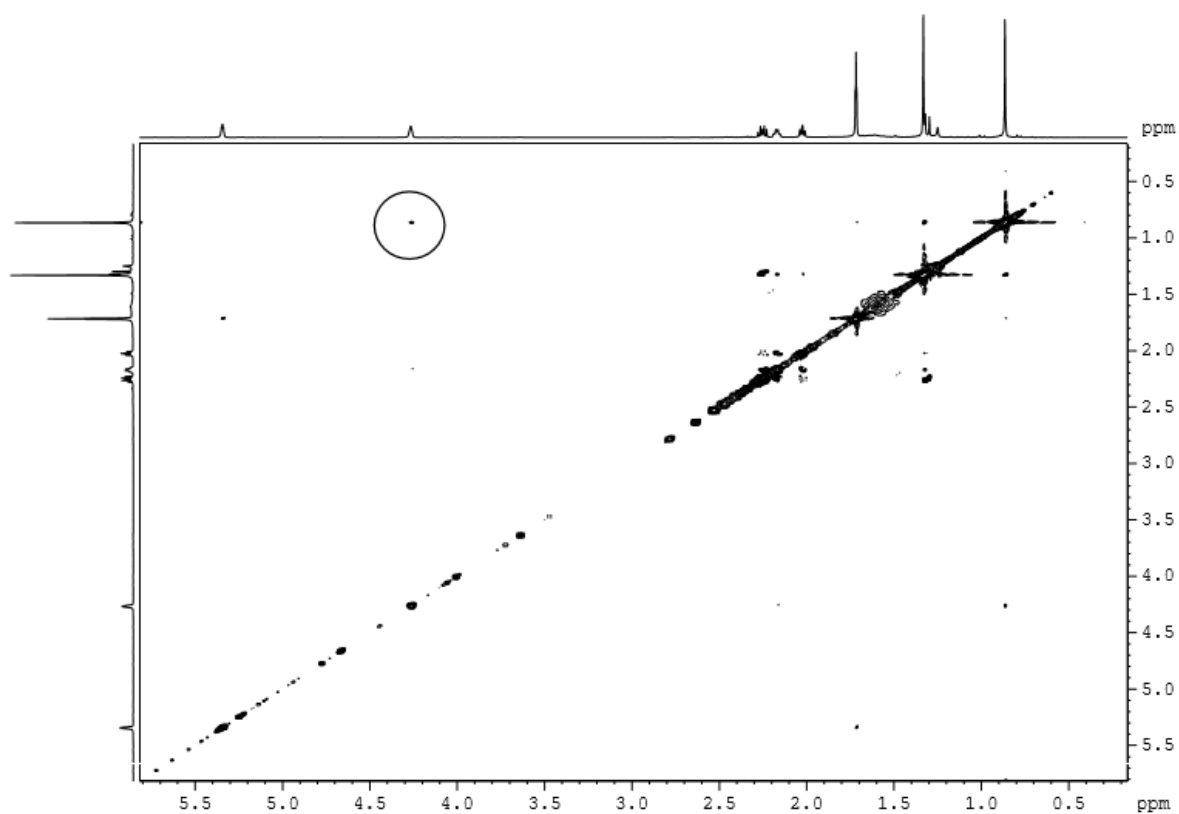
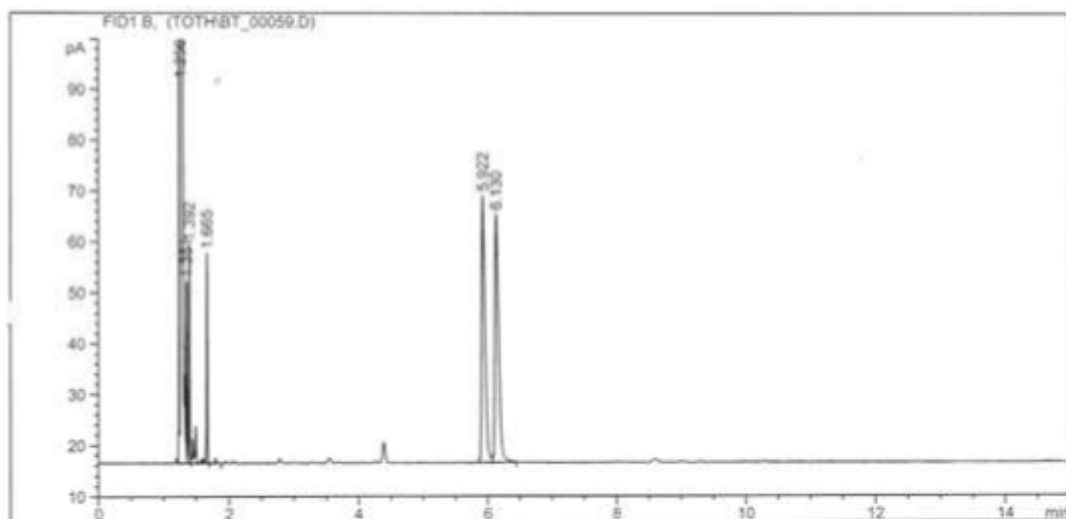


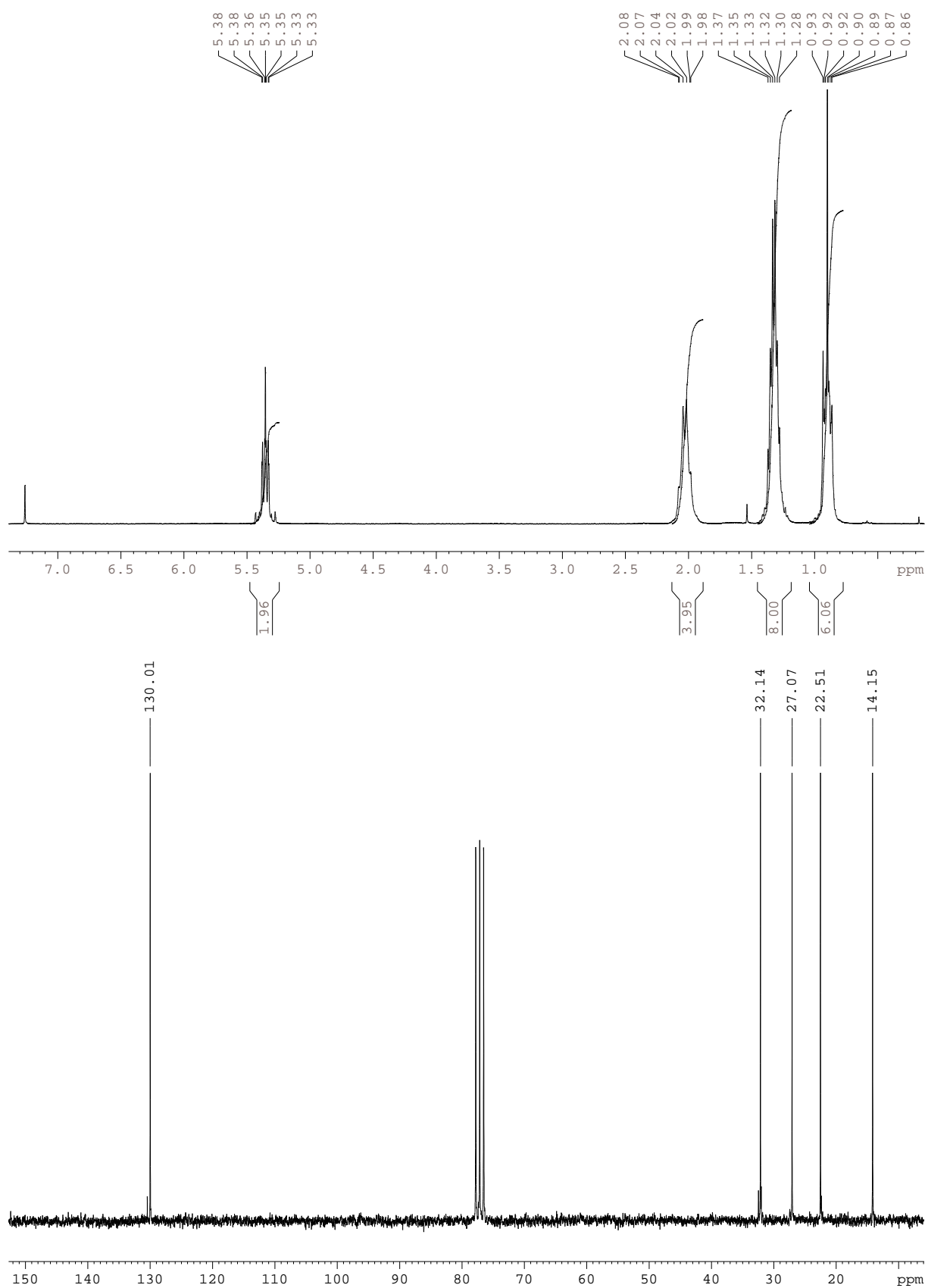
3-Caren-5-on **35**

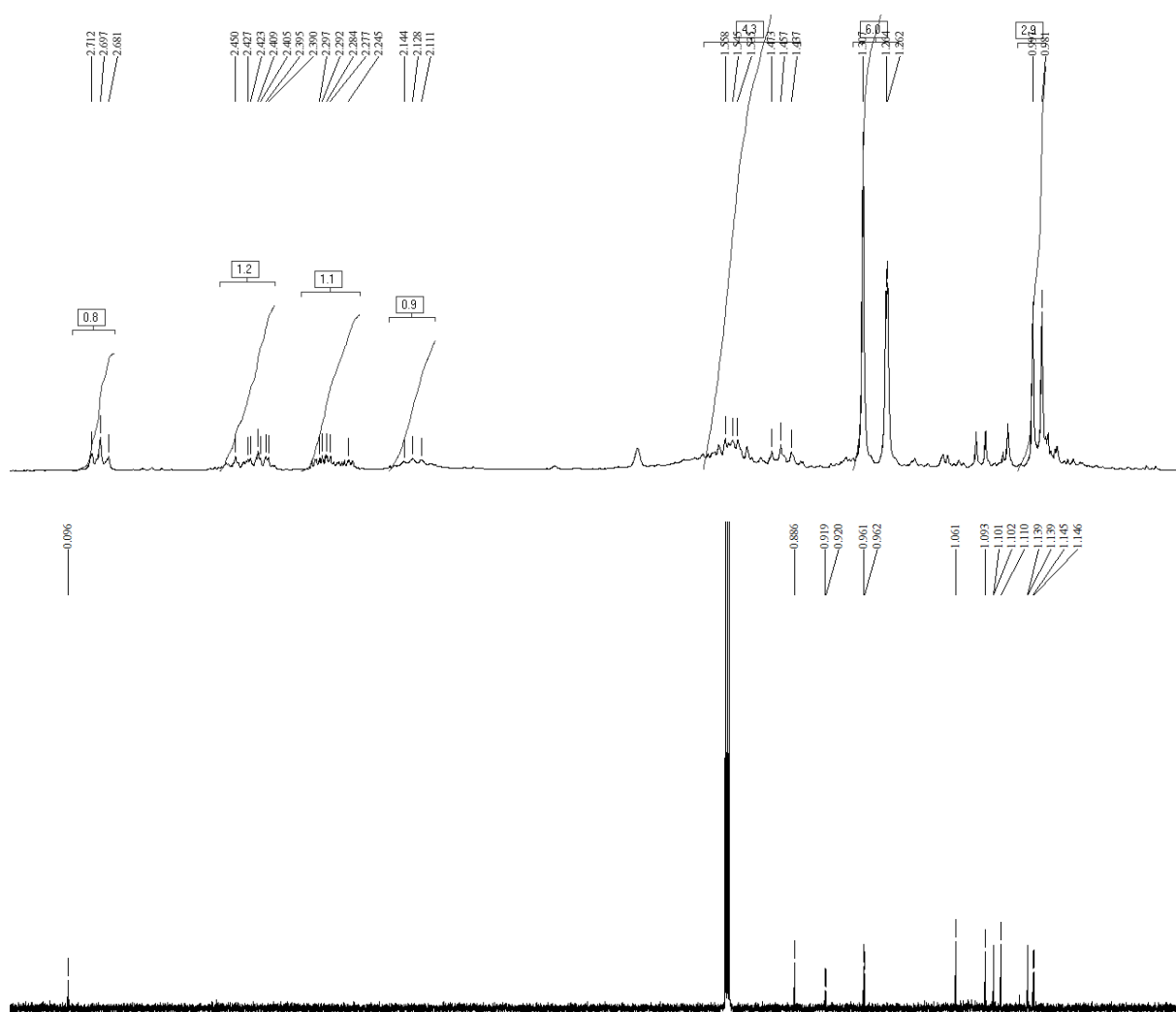
β -Ionon-4,5-Epoxid **39**

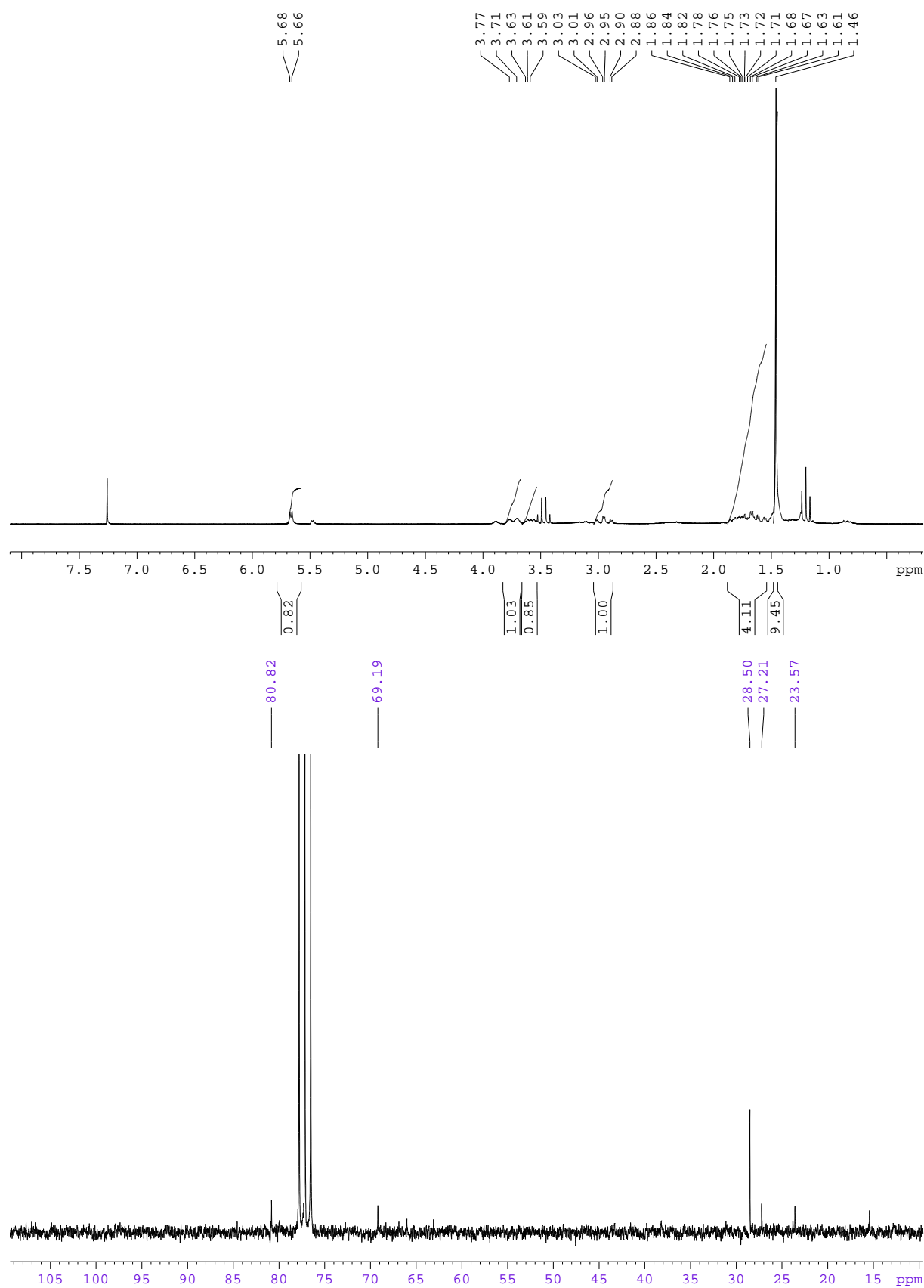
β -Ionon-4,5-Epoxid **39**

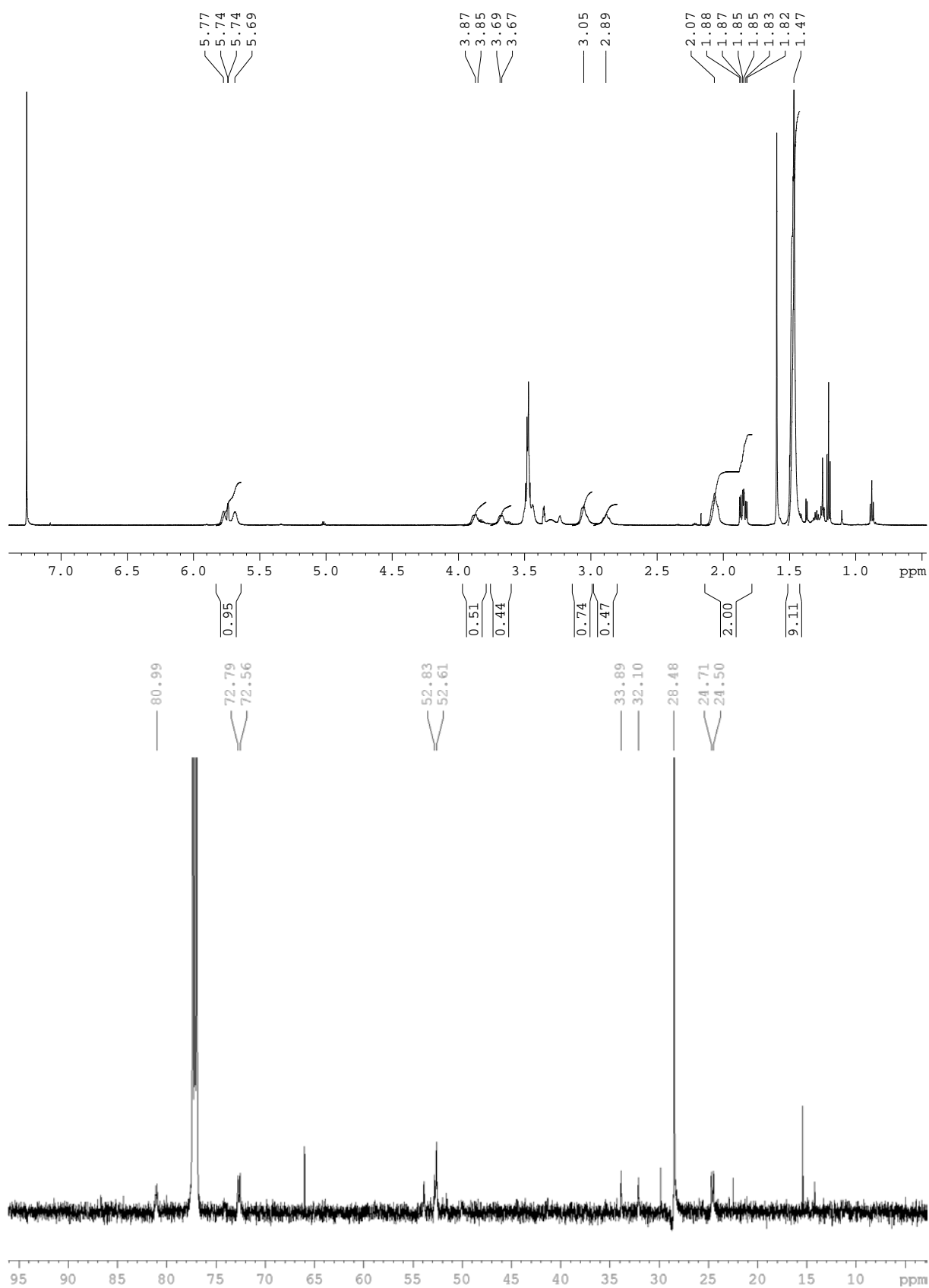
Verbenol **37**

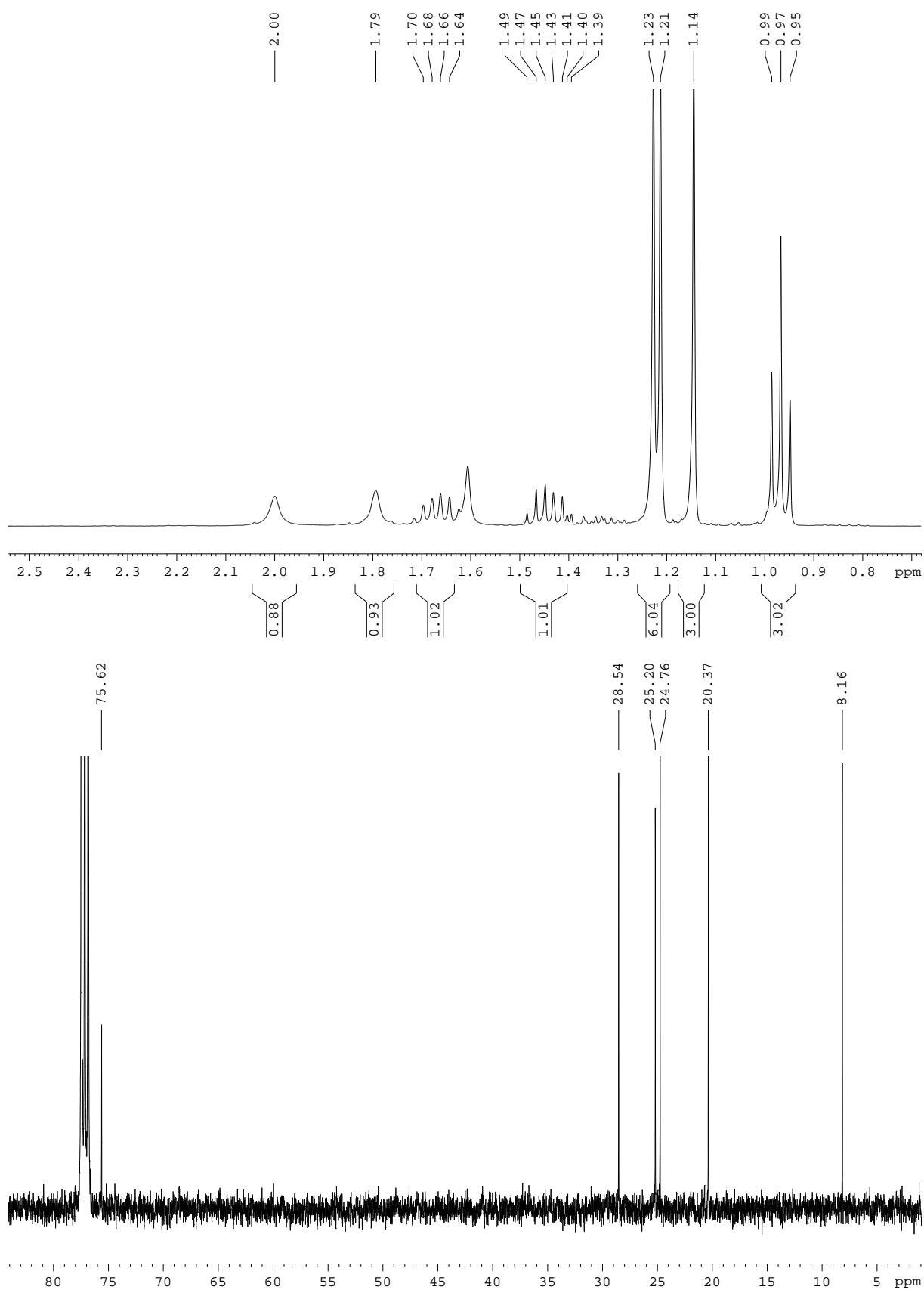
Verbenol **37**Cyclohexenol **47**

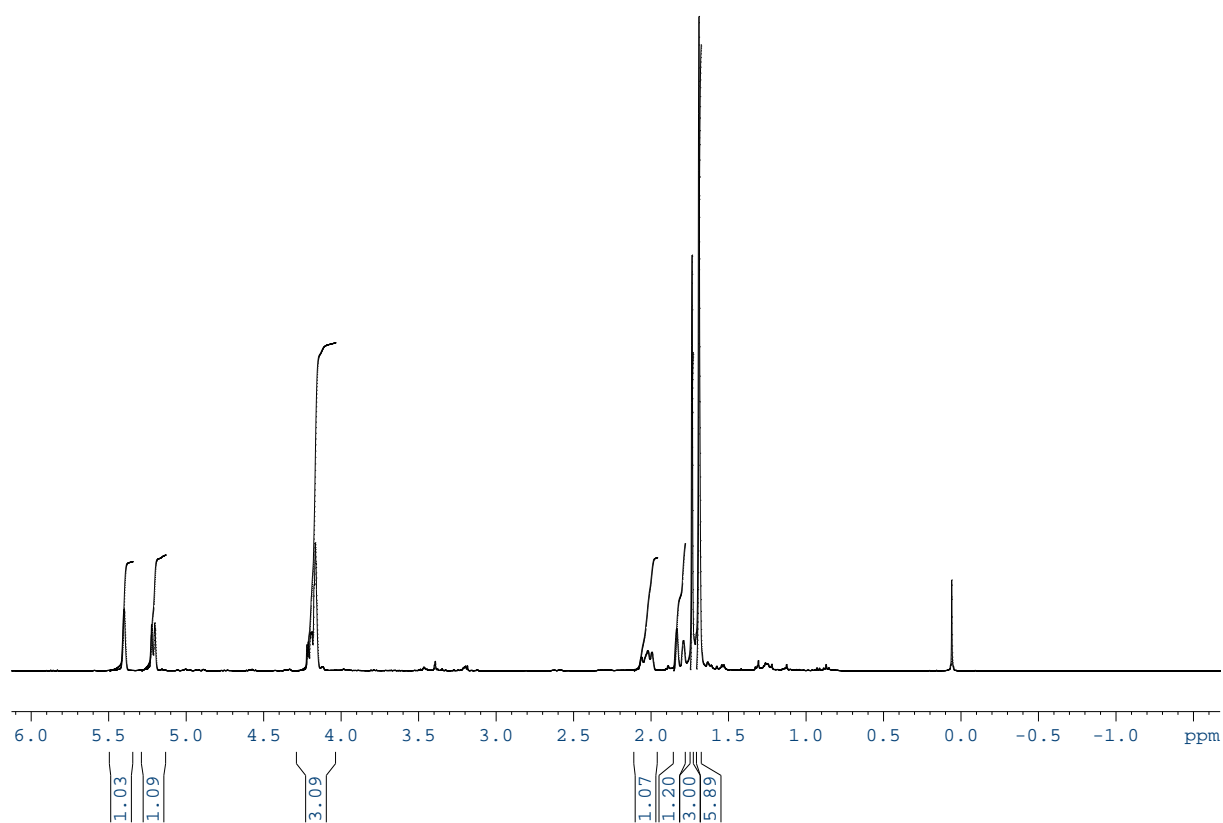
(Z)-Decen **92**

6,7-Epoxy-3,7-Dimethyloctanal **87**

N-Boc-2,3-Dihydropiperidin **81**

N-Boc-3,4-Dihydropiperidin **82**

2,3 dimethylpentan-2,3diol **94**

6-Brom-3,7-dimethyl-7-methoxyoct-2-en-1-ol **99**

138.28

126.06

63.45

59.13

49.84

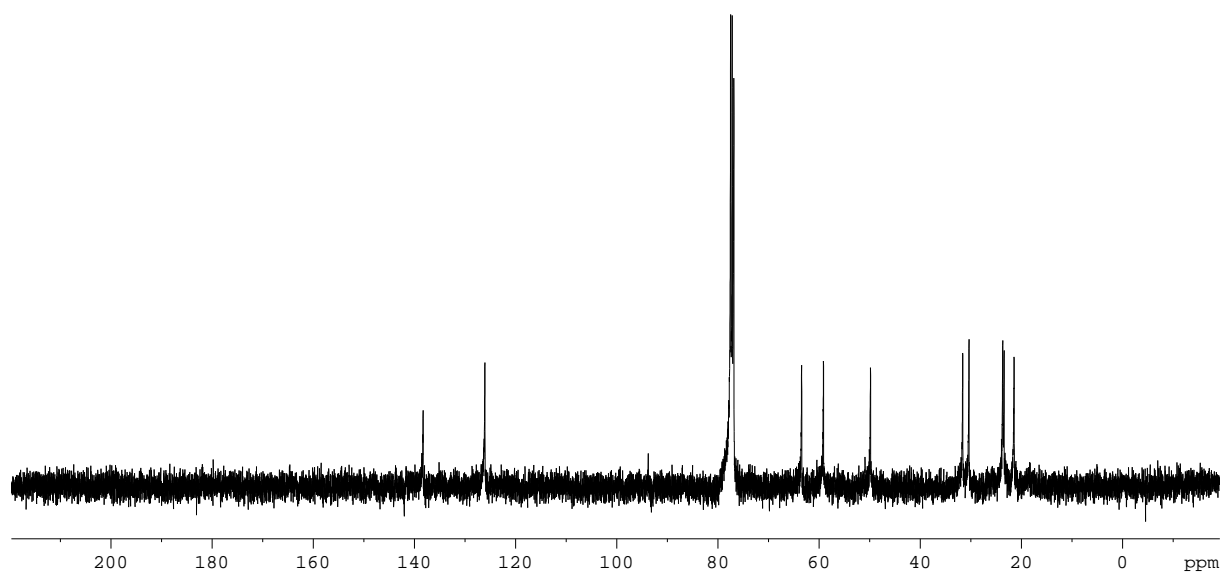
31.60

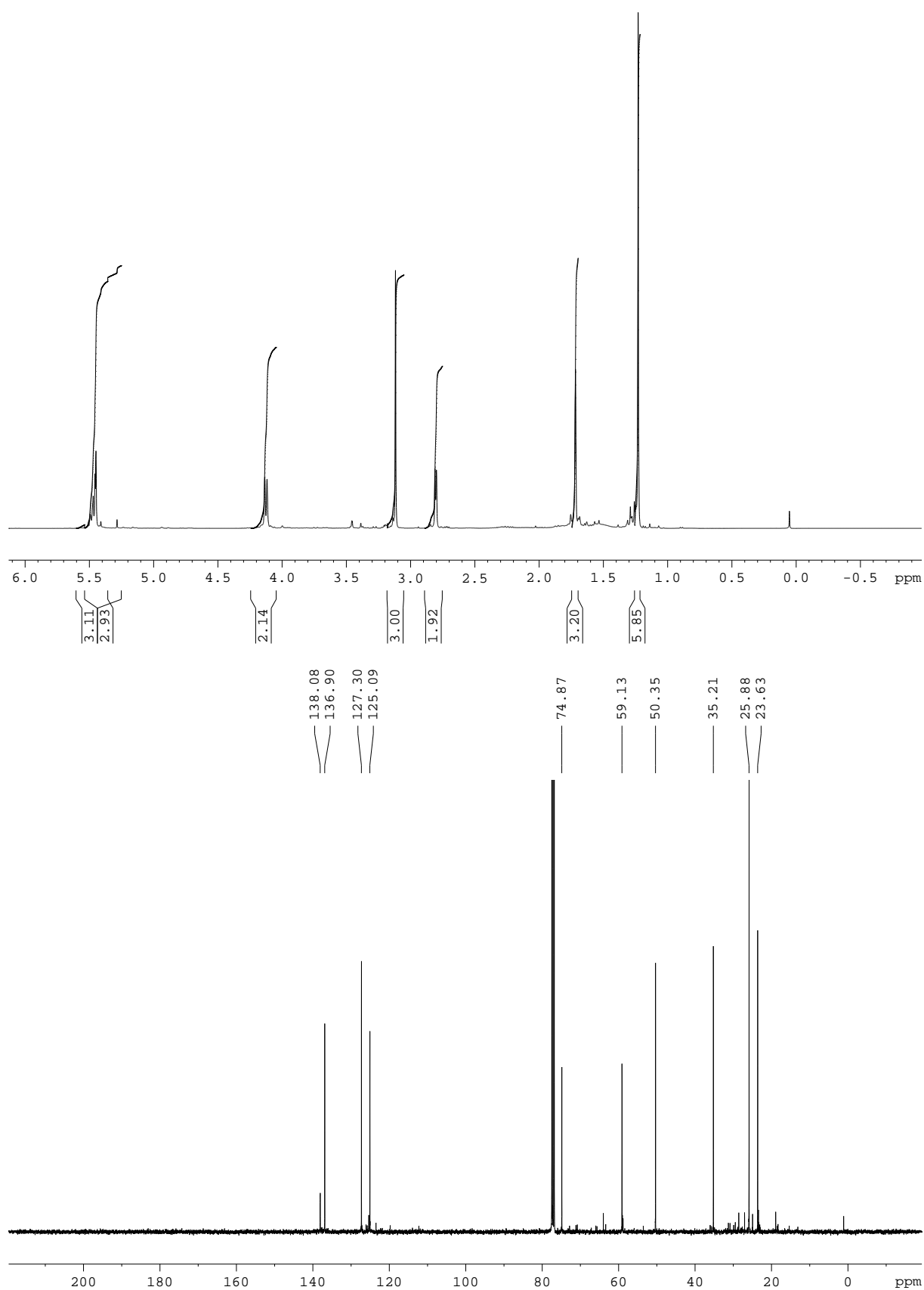
30.35

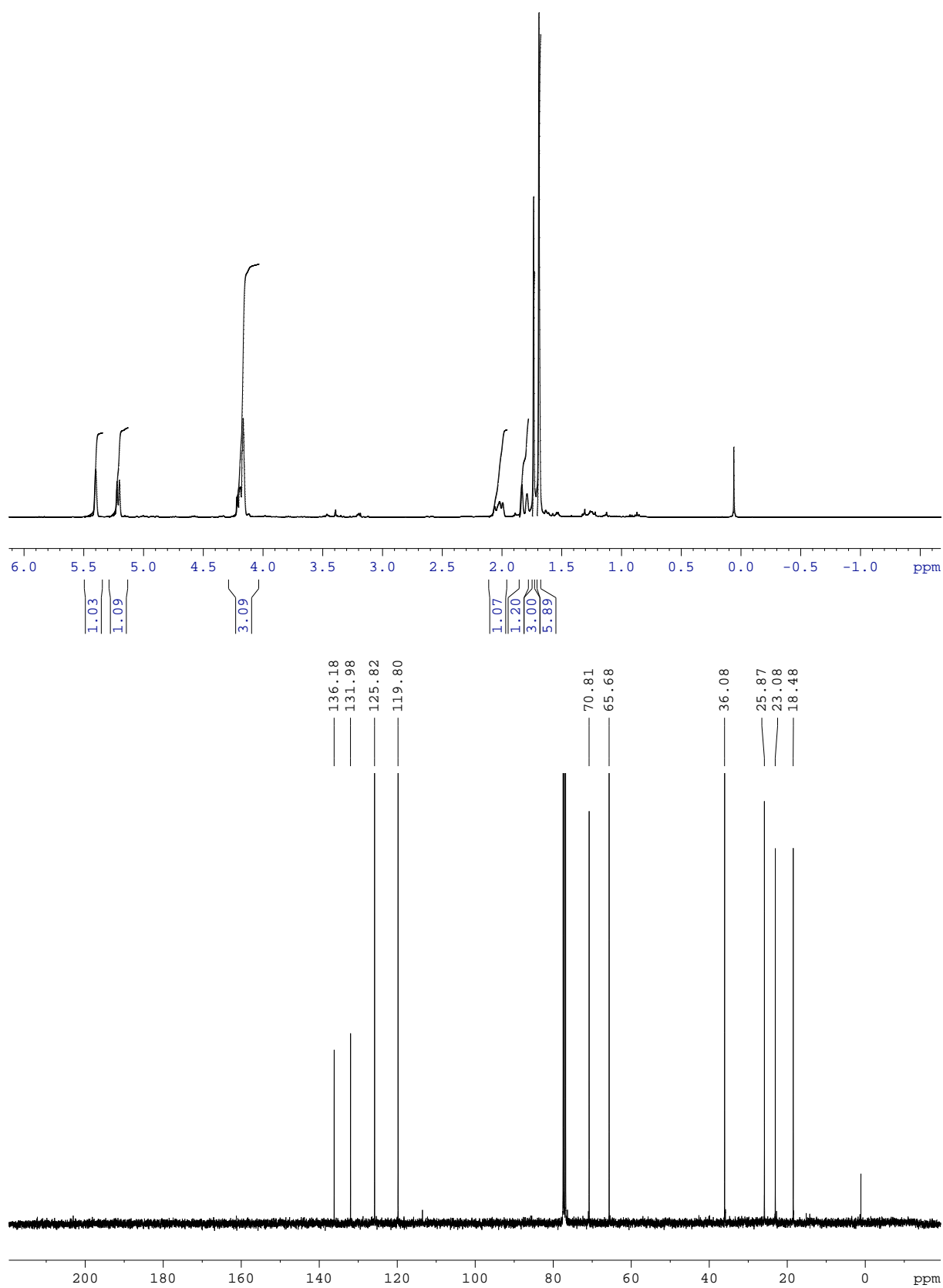
23.68

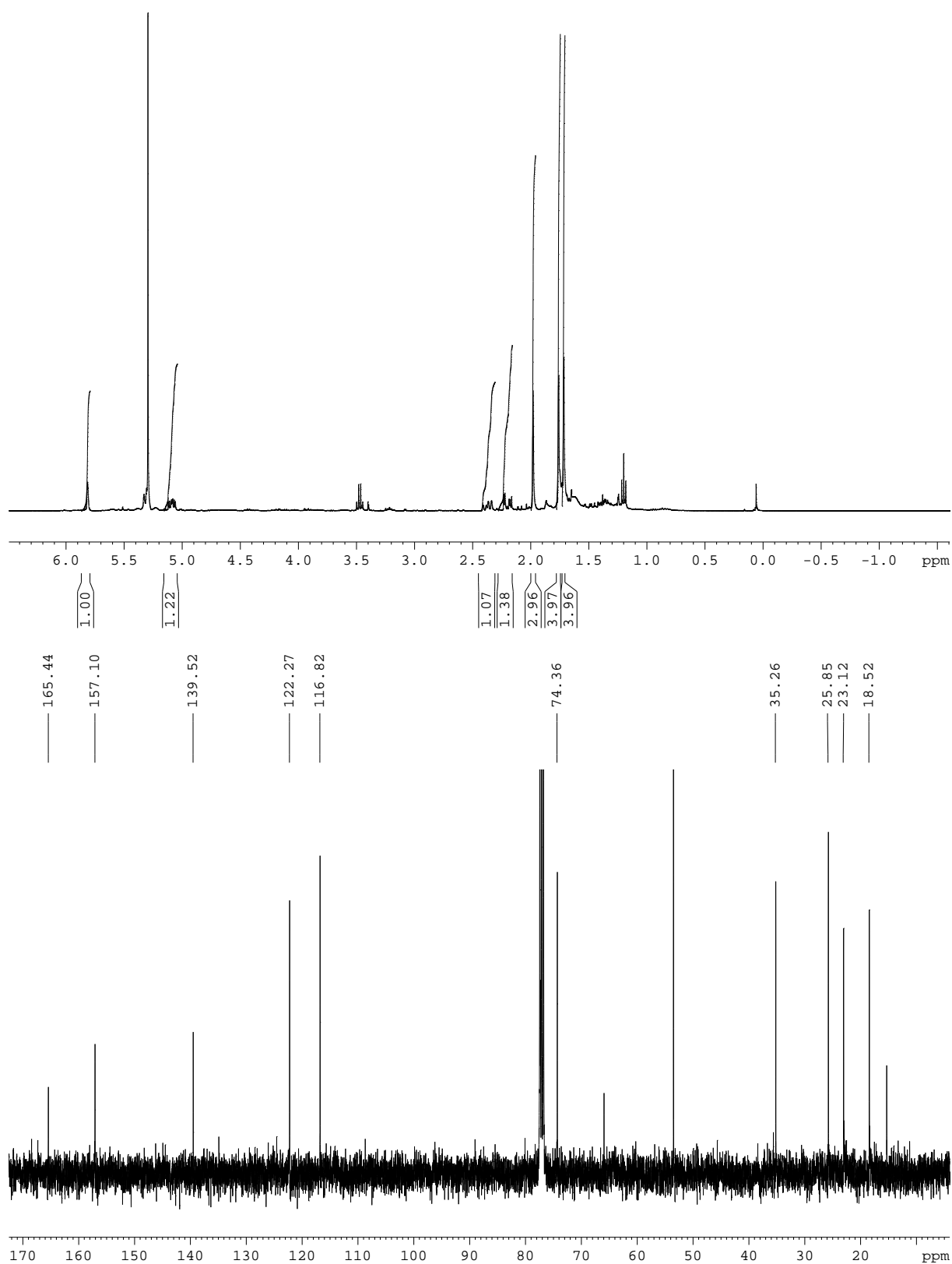
23.41

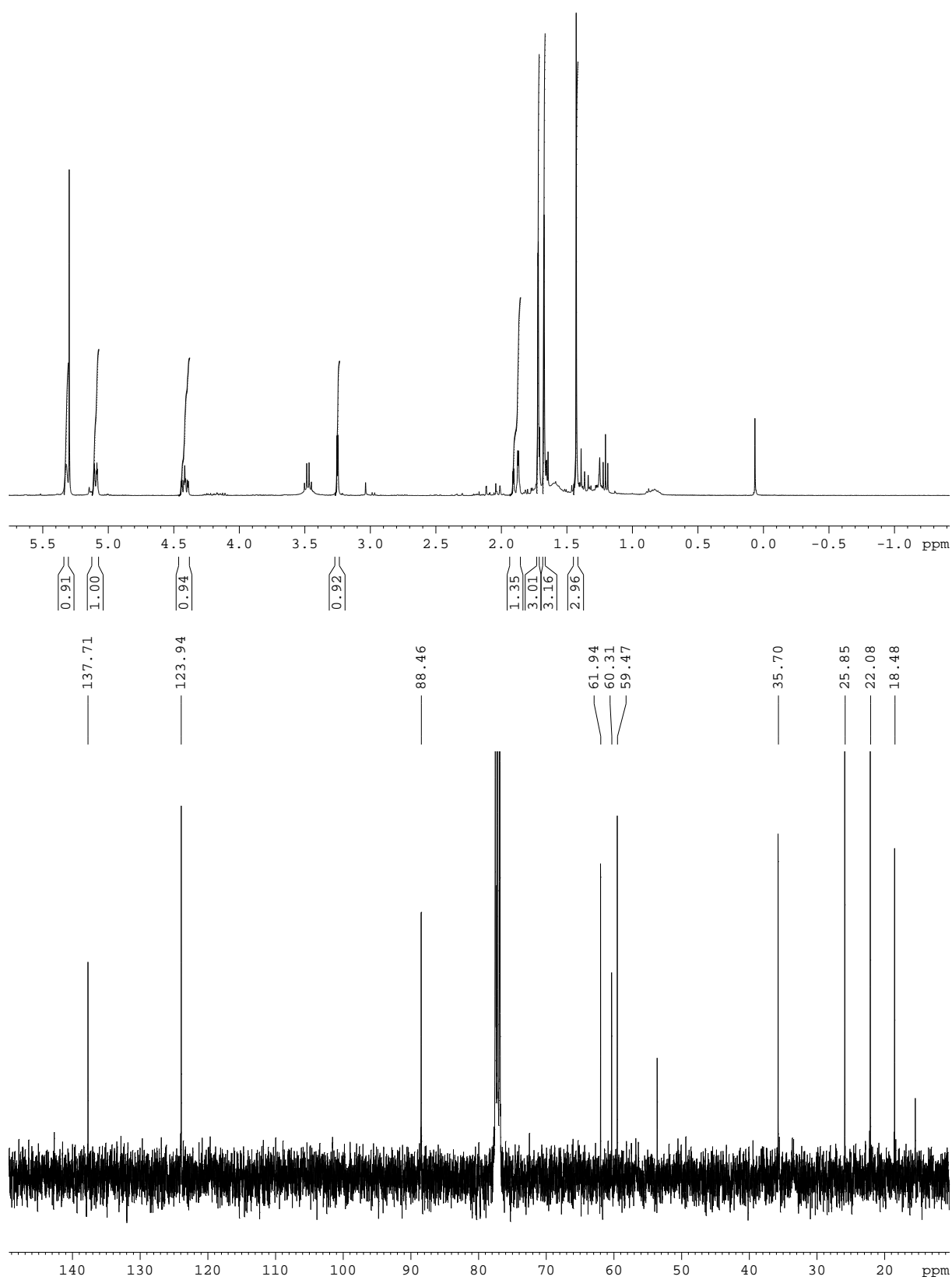
21.44



3,7-Dimethyl-7-methoxyocta-2,5-dien-1-ol **100**

Neroloxid **101**

Neroloxid-Lacton **102**

Neroloxid-Epoxid **103**

Literaturverzeichnis

- (1) Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K. *Nature* **2012**, *485*, 185.
- (2) Wenda, S.; Illner, S.; Mell, A.; Kragl, U. *Green Chem.* **2011**, *13*, 3007.
- (3) Clouthier, C. M.; Pelletier, J. N. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585.
- (4) Gaisser, S.; Nusser, M. *ZEFQ* **2010**, *104*, 732.
- (5) Huisman, G. W.; Collier, S. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 284.
- (6) Panke, S.; Wubbolts, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 188.
- (7) Pollard, D. J.; Woodley, J. M. *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 66.
- (8) Gueven, N.; Woolley, K.; Smith, J. *Redox Biology* **2015**, *4*, 289.
- (9) Pérez-Magariño, S.; González-Sanjosé, M. L. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*; Caballero, B., Ed.; Academic Press: Oxford, 2003, p 500.
- (10) Berger, R. G. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *1*, 38.
- (11) Zorn, H. *Biospektrum* **2011**, *17*, 356.
- (12) Wohlgemuth, R. *Curr. Opin. Biotech.* **2010**, *21*, 713.
- (13) Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Nature* **2001**, *409*, 258.
- (14) Bennett, J. W. *J. Biotechnol.* **1998**, *66*, 101.
- (15) Beresford, T. P.; Fitzsimons, N. A.; Brennan, N. L.; Cogan, T. M. *Int. Dairy J.* **2001**, *11*, 259.
- (16) Hulse, J. H. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 3.
- (17) Kirk, O.; Borchert, T. V.; Fuglsang, C. C. *Curr. Opin. Biotech.* **2002**, *13*, 345.
- (18) Gartland, K. M. A.; Bruschi, F.; Dundar, M.; Gahan, P. B.; Viola Magni, M. P.; Akbarova, Y. *Curr. Opin. Biotech.* **2013**, *24*, S6.
- (19) Perlitz, U. *Deutsche Bank Research. Aktuelle Themen. Frankfurt* **2007**.
- (20) Noyori, R. *Nat Chem* **2009**, *1*, 5.
- (21) Knockaert, M.; Manigart, S.; Cattoir, S.; Verstraete, W. *Biotechnol. Rep.* **2015**, *6*, 56.
- (22) Yang, G.; Ding, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5604.
- (23) Choi, J.-M.; Han, S.-S.; Kim, H.-S. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1443.
- (24) Drepper, T.; Eggert, T.; Hummel, W.; Leggewie, C.; Pohl, M.; Rosenau, F.; Jaeger, K. E. *Chem. Ing. Tech.* **2006**, *78*, 239.
- (25) Shabat, D.; Grynszpan, F.; Saphier, S.; Turniansky, A.; Avnir, D.; Keinan, E. *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 2258.
- (26) Wentworth Jr, P.; Janda, K. D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 138.
- (27) Ishikawa, F.; Uno, K.; Nishikawa, M.; Tsumuraya, T.; Fujii, I. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7011.
- (28) Shechner, D. M.; Bartel, D. P. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 1036.
- (29) Wochner, A.; Attwater, J.; Coulson, A.; Holliger, P. *Science* **2011**, *332*, 209.
- (30) Boersma, A. J.; Feringa, B. L.; Roelfes, G. *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3396.
- (31) Coquière, D.; Feringa, B. L.; Roelfes, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9308.
- (32) Silverman, S. K. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1369.
- (33) Saibi, W.; Abdeljalil, S.; Masmoudi, K.; Gargouri, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *426*, 289.
- (34) Elleuche, S.; Schröder, C.; Sahm, K.; Antranikian, G. *Curr. Opin. Biotech.* **2014**, *29*, 116.

- (35) Wilson, Z. E.; Brimble, M. A. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 44.
- (36) Cheetham, P. S. J. *Enzyme Microb. Technol.* **1987**, *9*, 194.
- (37) Breuer, M.; Stürmer, R. *Chem. Unserer Zeit* **2006**, *40*, 104.
- (38) Ogawa, J.; Shimizu, S. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 13.
- (39) Amann, R. I.; Ludwig, W.; Schleifer, K. H. *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 143.
- (40) Handelsman, J.; Rondon, M. R.; Brady, S. F.; Clardy, J.; Goodman, R. M. *Chem. Biol.* **1998**, *5*, R245.
- (41) Streit, W. R.; Schmitz, R. A. *Curr. Opin. Microbiol.* **2004**, *7*, 492.
- (42) Streit, W. R.; Daniel, R.; Jaeger, K.-E. *Curr. Opin. Biotech.* **2004**, *15*, 285.
- (43) Lorenz, P. *Chem. Ing. Tech.* **2006**, *78*, 461.
- (44) Bell, P. J. L.; Sunna, A.; Gibbs, M. D.; Curach, N. C.; Nevalainen, H.; Bergquist, P. L. *Microbiology* **2002**, *148*, 2283.
- (45) Beilen, J. B. v.; Li, Z. *Curr. Opin. Biotech.* **2002**, *13*, 338.
- (46) Loughlin, W. A. *Bioresour. Technol.* **2000**, *74*, 49.
- (47) Leresche, J. E.; Meyer, H.-P. *Org. Process Res. Dev.* **2006**, *10*, 572.
- (48) de Regil, R.; Sandoval, G. *Biomeolecules* **2013**, *3*, 812.
- (49) Straathof, A. J. J.; Panke, S.; Schmid, A. *Curr. Opin. Biotech.* **2002**, *13*, 548.
- (50) de Carvalho, C. C. C. R. *Biotechnol. Adv.*, *29*, 75.
- (51) Mei, Y.-Z.; Liu, R.-X.; Wang, D.-P.; Wang, X.; Dai, C.-C. *Biotechnol. Lett.* **2015**, *37*, 9.
- (52) Ben Akacha, N.; Gargouri, M. *Food Bioprod. Process.* **2014**.
- (53) Gallage, Nethaji J.; Møller, Birger L. *Mol. Plant* **2015**, *8*, 40.
- (54) Bosse, A. K.; Fraatz, M. A.; Zorn, H. *Food Chem.* **2013**, *141*, 2952.
- (55) Clardy, J.; Walsh, C. *Nature* **2004**, *432*, 829.
- (56) Bode, H. B.; Müller, R. *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6988.
- (57) Meichsner, B.; Wirth, U. *Chem. Unserer Zeit* **2009**, *43*, 340.
- (58) Monti, D.; Ottolina, G.; Carrea, G.; Riva, S. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4111.
- (59) Ding, S.; Cargill, A. A.; Medintz, I. L.; Claussen, J. C. *Curr. Opin. Biotech.* **2015**, *34*, 242.
- (60) Cirillo, G.; Nicoletta, F. P.; Curcio, M.; Spizzirri, U. G.; Picci, N.; Iemma, F. *React. Funct. Polym.* **2014**, *83*, 62.
- (61) Sheldon, R. A.; van Pelt, S. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223.
- (62) DiCosimo, R.; McAuliffe, J.; Poulouse, A. J.; Bohlmann, G. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6437.
- (63) Schrewe, M.; Julsing, M. K.; Buhler, B.; Schmid, A. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6346.
- (64) Padmakumar, R.; Oriel, P. In *Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*; Davison, B., Finkelstein, M., Eds.; Humana Press: 1999, p 671.
- (65) Asano, Y.; Yasuda, T.; Tani, Y.; Yamada, H. *Agr. Biol. Chem.* **1982**, *46*, 1183.
- (66) Reetz, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480.
- (67) Aldridge, S. *Nat Biotech* **2013**, *31*, 95.
- (68) Barends, T. R. M.; Yoshida, H.; Dijkstra, B. W. *Curr. Opin. Biotech.* **2004**, *15*, 356.
- (69) Kim, D.; Wang, L.; Beconi, M.; Eiermann, G. J.; Fisher, M. H.; He, H.; Hickey, G. J.; Kowalchick, J. E.; Leiting, B.; Lyons, K.; Marsilio, F.; McCann, M. E.; Patel, R. A.; Petrov, A.; Scapin, G.; Patel, S. B.; Roy, R. S.; Wu, J. K.; Wyvratt, M. J.; Zhang, B. B.; Zhu, L.; Thornberry, N. A.; Weber, A. E. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 141.
- (70) Kendall, D. M.; Cuddihy, R. M.; Bergenstal, R. M. *Eur. J. Int. Med.* **2009**, *20*, Supplement 2, S329.
- (71) Desai, A. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1974.

- (72) Savile, C. K.; Janey, J. M.; Mundorff, E. C.; Moore, J. C.; Tam, S.; Jarvis, W. R.; Colbeck, J. C.; Krebber, A.; Fleitz, F. J.; Brands, J.; Devine, P. N.; Huisman, G. W.; Hughes, G. J. *Science* **2010**, 329, 305.
- (73) Janssens, L.; Depooter, H. L.; Schamp, N. M.; Vandamme, E. J. *Process Biochem. (Amsterdam, Neth.)* **1992**, 27, 195.
- (74) Gershenzon, J.; Dudareva, N. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 408.
- (75) Dewick, P. M. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 181.
- (76) Lynen, F. *Pure Appl. Chem.* **1967**, 14, 137.
- (77) Lichtenthaler, H. K. *Annu. Rev. Plant Phys.* **1999**, 50, 47.
- (78) Bohlmann, J.; Keeling, C. I. *Plant J.* **2008**, 54, 656.
- (79) Ohloff, G. *Scent and fragrances: The fascination of odors and their chemical perspectives*; Springer: Berlin, 1994.
- (80) Crowell, P. L. *J. Nutr.* **1999**, 129, 775.
- (81) Sikkema, J.; de Bont, J. A.; Poolman, B. *Microbiol. Rev.* **1995**, 59, 201.
- (82) Bouws, H.; Wattenberg, A.; Zorn, H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 80, 381.
- (83) Berger, R. *Biotechnol. Lett.* **2009**, 31, 1651.
- (84) Krings, U.; Lehnert, N.; Fraatz, M. A.; Hardebusch, B. r.; Zorn, H.; Berger, R. G. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 9944.
- (85) Lomascolo, A.; Stentelaire, C.; Asther, M.; Lesage-Meessen, L. *Trends Biotechnol.* **1999**, 17, 282.
- (86) Fraatz, M.; Zorn, H. In *Industrial Applications*; Hofrichter, M., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: 2011; Vol. 10, p 249.
- (87) Ander, P.; Hatakka, A.; Eriksson, K.-E. *Arch. Microbiol.* **1980**, 125, 189.
- (88) Stentelaire, C.; Lesage-Meessen, L.; Delattre, M.; Haon, M.; Sigoillot, J. C.; Ceccaldi, B. C.; Asther, M. *World J. Microb. Biot.* **1997**, 14, 285.
- (89) Lesage-Meessen, L.; Delattre, M.; Haon, M.; Thibault, J.-F.; Ceccaldi, B. C.; Brunerie, P.; Asther, M. *J. Biotechnol.* **1996**, 50, 107.
- (90) Beck, H. C. *Biosynthetic pathway for halogenated methoxybenzaldehydes in the white rot fungus Bjerkandera adusta*, 1997; Vol. 149.
- (91) Gutiérrez, A.; Caramelo, L.; Prieto, A.; Martínez, M. J.; Martínez, A. T. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 60, 1783.
- (92) Zorn, H.; Fischer-Zorn, M.; Berger, R. G. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 367.
- (93) Del Rio, J. A.; Ortuno, A.; Garcia-Puig, D.; Porras, I.; Garcia-Lidon, A.; Sabater, F. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 1488.
- (94) JR., W. D. M.; BUIGUES, N. M. *J. Food Sci.* **1964**, 29, 565.
- (95) Ortuno, A.; Garciapuig, D.; Fuster, M. D.; Perez, M. L.; Sabater, F.; Porras, I.; Garcialidon, A.; Delrio, J. A. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 1.
- (96) Wriessnegger, T.; Augustin, P.; Engleder, M.; Leitner, E.; Müller, M.; Kaluzna, I.; Schürmann, M.; Mink, D.; Zellnig, G.; Schwab, H.; Pichler, H. *Metab. Eng.* **2014**, 24, 18.
- (97) Kaspera, R.; Krings, U.; Nanzad, T.; Berger, R. G. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 67, 477.
- (98) Fraatz, M. A.; Berger, R. G.; Zorn, H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 83, 35.
- (99) Fraatz, M. A.; Riemer, S. J. L.; Stöber, R.; Kaspera, R.; Nimtz, M.; Berger, R. G.; Zorn, H. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, 61, 202.
- (100) Krugener, S.; Krings, U.; Zorn, H.; Berger, R. G. *Bioresour. Technol.* **2010**, 101, 457.

- (101) Weidmann, V.; Maison, W. *Synthesis* **2013**, 45, 2201.
- (102) Page, P. C. B.; McCarthy, T. J. In *Comprehensive Organic Synthesis*; Fleming, B. M. T., Ed.; Pergamon: Oxford, 1991, p 83.
- (103) Roduner, E.; Kaim, W.; Sarkar, B.; Urlacher, V. B.; Pleiss, J.; Gläser, R.; Einicke, W.-D.; Sprenger, G. A.; Beifuß, U.; Klemm, E.; Liebner, C.; Hieronymus, H.; Hsu, S.-F.; Plietker, B.; Laschat, S. *ChemCatChem* **2013**, 5, 82.
- (104) Hanson, J. R. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, 24, 1342.
- (105) Muzart, J. *Chem. Rev.* **1992**, 92, 113.
- (106) Muzart, J. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2009**, 6, 9.
- (107) Stavely, H. E.; Bollenback, G. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, 65, 1285.
- (108) Whitmore, F. C.; Pedlow, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, 63, 758.
- (109) Marshall, C. W.; Ray, R. E.; Laos, I.; Riegel, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 6308.
- (110) Goldblum, A.; Mechoulam, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 1889.
- (111) Mechoulam, R.; Luchter, K.; Goldblum, A. *Synthesis* **1974**, 1974, 363.
- (112) Enzell, C. *Tetrahedron Lett.* **1962**, 3, 185.
- (113) Dauben, W. G.; Lorber, M.; Fullerto, D. *J. Org. Chem.* **1969**, 34, 3587.
- (114) Muzart, J. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1986**, 65.
- (115) Poos, G. I.; Arth, G. E.; Beyler, R. E.; Sarett, L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 422.
- (116) Holum, J. R. *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 4814.
- (117) Collins, J. C.; Hess, W. W.; Frank, F. J. *Tetrahedron Lett.* **1968**, 9, 3363.
- (118) Parish, E. J.; Chitrakorn, S.; Taylor, F. R.; Saucier, S. E. *Chem. Phys. Lipids* **1984**, 36, 179.
- (119) Müller, R. K.; Bernhard, K.; Kienzle, F.; Mayer, H.; Rüttimann, A. *Food Chem.* **1980**, 5, 15.
- (120) Müller, R. K.; Mayer, H.; Noack, K.; Daly, J. J.; Tauber, J. D.; Liaaen-Jensen, S. *Helv. Chim. Acta* **1978**, 61, 2881.
- (121) Parish, E. J.; Wei, T.-Y. *Synth. Commun.* **1987**, 17, 1227.
- (122) Marwah, P.; Lardy, H. A. *Humanetics Corp.* **2002**.
- (123) Salvador, J. A. R.; Silvestre, S. M.; Moreira, V. M. *Curr. Org. Chem.* **2006**, 10, 2227.
- (124) Salvador, J. A. R.; Silvestre, S. M.; Moreira, V. M. *Curr. Org. Chem.* **2008**, 12, 492.
- (125) Foustieris, M. A.; Koutsourea, A. I.; Nikolaropoulos, S. S.; Riahi, A.; Muzart, J. J. *Mol. Catal. A: Chem.* **2006**, 250, 70.
- (126) Pearson, A. J.; Chen, Y.-S.; Hsu, S.-Y.; Ray, T. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 1235.
- (127) Pearson, A. J.; Chen, Y.-S.; Han, G. R.; Hsu, S.-Y.; Ray, T. *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 1* **1985**, 267.
- (128) Collman, J. P.; Kubota, M.; Hosking, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 4809.
- (129) Dudley, C.; Read, G. *Tetrahedron Lett.* **1972**, 13, 5273.
- (130) Kurkov, V. P.; Pasky, J. Z.; Lavigne, J. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 4743.
- (131) Fusi, A.; Ugo, R.; Fox, F.; Pasini, A.; Cenini, S. *J. Organomet. Chem.* **1971**, 26, 417.
- (132) Uemur, S.; Patil, S. R. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 4353.
- (133) McLaughlin, E. C.; Choi, H.; Wang, K.; Chiou, G.; Doyle, M. P. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 730.
- (134) Choi, H.; Doyle, M. P. *Org. Lett.* **2007**, 9, 5349.
- (135) Groves, J. T.; Quinn, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 5790.
- (136) Thompson, M. S.; Meyer, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 4106.
- (137) Thompson, M. S.; Meyer, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 5070.

- (138) Seok, W. K.; Dobson, J. C.; Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 3.
- (139) Neumann, R.; Abu-Gnim, C. J. *Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6025.
- (140) Murahashi, S.-I.; Oda, Y.; Naota, T.; Kuwabara, T. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1299.
- (141) Miller, R. A.; Li, W.; Humphrey, G. R. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3429.
- (142) Shingate, B. B.; Hazra, B. G.; Salunke, D. B.; Pore, V. S. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 6007.
- (143) Yu, J.-Q.; Corey, E. J. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2727.
- (144) Muzart, J.; Pale, P.; Pete, J.-P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1981**, 668.
- (145) Trost, B. M.; Strege, P. E.; Weber, L.; Fullerton, T. J.; Dietsche, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3407.
- (146) Muzart, J.; Pete, J.-P.; Riahi, A. J. *Organomet. Chem.* **1987**, *331*, 113.
- (147) Muzart, J.; Pale, P.; Pete, J.-P. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 3577.
- (148) Hosokawa, T.; Inui, S.; Murahashi, S.-I. *Chem. Lett.* **1983**, *12*, 1081.
- (149) Yu, J.-Q.; Wu, H.-C.; Corey, E. J. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1415.
- (150) Islam, M.; Mondal, P.; Roy, A. S.; Tuhina, K. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *118*, 52.
- (151) Birnbaum, E. R.; Grinstaff, M. W.; Labinger, J. A.; Bercaw, J. E.; Gray, H. B. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1995**, *104*, L119.
- (152) Appleton, A. J.; Evans, S.; Smith, J. R. L. *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 2* **1996**, 281.
- (153) González, L. M.; Villa de P, A. L.; Montes de C, C.; Sorokin, A. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6465.
- (154) Smeureanu, G.; Aggarwal, A.; Soll, C. E.; Arijeloye, J.; Malave, E.; Drain, C. M. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12133.
- (155) Andrus, M. B.; Lashley, J. C. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 845.
- (156) Salvador, J. A. R.; Sáe Melo, M. L.; Campos Neves, A. S. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 119.
- (157) Li, Y.; Wu, X.; Lee, T. B.; Isbell, E. K.; Parish, E. J.; Gorden, A. E. V. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1807.
- (158) Barton, D. H. R.; Crich, D. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 4359.
- (159) Crich, D.; Zou, Y. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 775.
- (160) Barton, D. H. R.; Wang, T.-L. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5149.
- (161) Umbreit, M. A.; Sharpless, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5526.
- (162) Gramatica, P.; Manitto, P.; Monti, D.; Speranza, G. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 4481.
- (163) Sakai, K.; Ohtsuka, T.; Misumi, S.; Shirahama, H.; Matsumoto, T. *Chem. Lett.* **1981**, *10*, 355.
- (164) Yin, C.; Yang, Z.; Li, B.; Zhang, F.; Wang, J.; Ou, E. *Catal. Lett.* **2009**, *131*, 440.
- (165) Tonigold, M.; Lu, Y.; Mavrandonakis, A.; Puls, A.; Staudt, R.; Möllmer, J.; Sauer, J.; Volkmer, D. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 8671.
- (166) Lajunen, M. K.; Maunula, T.; Koskinen, A. M. P. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8167.
- (167) Lajunen, M.; Koskinen, A. M. P. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4461.
- (168) Jurado-Gonzalez, M.; Sullivan, A. C.; Wilson, J. R. H. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4283.
- (169) Salvador, J. A. R.; Clark, J. H. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2001**, 33.
- (170) Silva, F.; Jacinto, M.; Landers, R.; Rossi, L. *Catal. Lett.* **2011**, *141*, 432.
- (171) Menini, L.; Pereira, M. C.; Parreira, L. A.; Fabris, J. D.; Gusevskaya, E. V. *J. Catal.* **2008**, *254*, 355.
- (172) Mihelich, E. D.; Eickhoff, D. J. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4135.
- (173) Schenck, G. O.; Neumüller, O. A.; Eisfeld, W. *Liebigs Ann. Chem.* **1958**, *618*, 202.

- (174) Marwah, P.; Marwah, A.; Lardy, H. A. *Green Chem.* **2004**, 6, 570.
- (175) Silvestre, S. M.; Salvador, J. A. R. *Tetrahedron* **2007**, 63, 2439.
- (176) Marwah, P.; Lardy, H. A. 2000.
- (177) Koek, T. J. *Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1999**, 71, 83.
- (178) Duetz, W. A.; Bouwmeester, H.; van Beilen, J. B.; Witholt, B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 61, 269.
- (179) Li, Z.; van Beilen, J. B.; Duetz, W. A.; Schmid, A.; de Raadt, A.; Griengl, H.; Witholt, B. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 136.
- (180) Fritz-Langhals, E.; Kunath, B. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 5955.
- (181) Niku-Paavola, M. L.; Viikari, L. J. *Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, 10, 435.
- (182) Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Buehler, K.; Schallmeyer, A.; Buhler, B. *Green Chem.* **2011**, 13, 226.
- (183) Clapp, C. H.; Strulson, M.; Rodriguez, P. C.; Lo, R.; Novak, M. J. *Biochemistry* **2006**, 45, 15884.
- (184) Clapp, C. H.; Senchak, S. E.; Stover, T. J.; Potter, T. C.; Findeis, P. M.; Novak, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 747.
- (185) Lehnert, N.; Krings, U.; Sydes, D.; Wittig, M.; Berger, R. G. *J. Biotechnol.* **2012**, 159, 329.
- (186) Onken, J.; Berger, R. G. *J. Biotechnol.* **1999**, 69, 163.
- (187) Zorn, H.; Breithaupt, D. E.; Takenberg, M.; Schwack, W.; Berger, R. G. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, 32, 623.
- (188) Fraatz, M. A., Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2007.
- (189) Kuyukina, M. S.; Ivshina, I. B.; Korshunova, I. O.; Rubtsova, E. V. *J. Microbiol. Methods* **2014**, 107, 23.
- (190) Torres, S.; Pandey, A.; Castro, G. R. *Biotechnol. Adv.* **2011**, 29, 442.
- (191) Inoue, A.; Horikoshi, K. *J. Ferment. Bioeng.* **1991**, 71, 194.
- (192) Zaks, A.; Russell, A. J. *J. Biotechnol.* **1988**, 8, 259.
- (193) Hollmann, F.; Kara, S. *Biospektrum* **2014**, 20, 100.
- (194) Hirose, Y.; Kariya, K.; Sasaki, I.; Kurono, Y.; Ebiike, H.; Achiwa, K. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 7157.
- (195) Carrea, G.; Riva, S. *Angew. Chem.* **2000**, 112, 2312.
- (196) Doukyu, N.; Ogino, H. *Biochem. Eng. J.* **2010**, 48, 270.
- (197) de Carvalho, C. C.; da Fonseca, M. M. *Biotechnol Adv* **2006**, 24, 134.
- (198) Harderbusch, B., Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2006.
- (199) Pattekhani, H. H.; Varadaraj, M. C.; Keshava, N.; Divakar, S. *Biotechnol. Tech.* **1997**, 11, 379.
- (200) Pinder, A. R. *Chemistry of the Terpenes*; Chapman and Hall: London, 1960.
- (201) Yoo, S. K.; Day, D. F.; Cadwallader, K. R. *Process Biochem. (Amsterdam, Neth.)* **2001**, 36, 925.
- (202) Busi, S.; Gs, R.; S, P. *Curr. Catal.* **2012**, 1, 129.
- (203) Trytek, M.; Jędrzejewski, K.; Fiedurek, J. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, 42, 181.
- (204) Trudgill, P. In *Biochemistry of microbial degradation*; Ratledge, C., Ed.; Springer Netherlands: 1994, p 33.
- (205) Lobinger, G. *Forstschutz Aktuell* **2006**, 37, 11.
- (206) Weidmann, V.; Schaffrath, M.; Zorn, H.; Rehbein, J.; Maison, W. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9, 2233.

- (207) Rothenberg, G.; Sasson, Y. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 5417.
- (208) Bernardi, R.; Caronna, T.; Coggiola, D.; Ganazzoli, F.; Morrocchi, S. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1045.
- (209) Laarhoven, L. J. J.; Mulder, P.; Wayner, D. D. M. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 342–349.
- (210) Naves, Y. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1971**, *22*, 439.
- (211) Isoe, S.; Be Hyeon, S.; Sakan, T. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10*, 279.
- (212) Dionísio, A. P.; Uenojo, M.; Barros, F. F. C.; Bicas, J. L.; dos Santos, R.; de Quadros, C. P.; Neri, I. A.; Pastore, G. M. *J. Biotechnol.* **2007**, *131*, S167.
- (213) Kite, G. C.; Salazar, G. A. *Rev. Mex. Biodiv.* **2008**, *79*, 153.
- (214) Cavani, F.; Teles, J. H. *ChemSusChem* **2009**, *2*, 508.
- (215) Roberts, S. M.; Whittall, J. *Catalysts for Fine Chemical Synthesis, Regio- and Stereo-Controlled Oxidations and Reductions*; John Wiley & Sons, 2007; Vol. 5.
- (216) Janitschke, L.; Hoffmann, W.; Google Patents: 1985.
- (217) Peng, Z.; Lu, G. *Catal. Lett.* **2007**, *117*, 126.
- (218) Tennant, R. *Environ. Health Perspect.* **1999**, *107*, A390.
- (219) Bosser, A.; Paplorey, E.; Belin, J.-M. *Biotechnol. Prog.* **1995**, *11*, 689.
- (220) von Schantz, M.; Huhtikangas, A. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 1787.
- (221) Bauer, K.; Garbe, D.; Surburg, H. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses, Fourth Edition* **2001**, 167.
- (222) Longo, M. A.; Sanromán, M. A. *Food Tech. Biotech.* **2006**, *44*, 335.
- (223) Singh, B.; Patial, J.; Sharma, P.; Agarwal, S. G.; Qazi, G. N.; Maity, S. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2007**, *266*, 215.
- (224) Wu, F.; Xu, Z.; Wang, Z.; Shi, Y.; Li, L.; Zhang, Z. *Chem. Eng. J. (Lausanne)* **2010**, *158*, 426.
- (225) Bombarda, I.; Smadja, J.; Gaydou, E. M.; Conan, J. Y.; Faure, R. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 138.
- (226) Burdock, G. A. *Encyclopedia of food and color additives*; CRC Press, 1997; Vol. 3.
- (227) Nicholson, D.; Gobert, J.; Google Patents: 2002.
- (228) Rickert, A.; Krombach, V.; Hamers, O.; Zorn, H.; Maison, W. *Green Chem.* **2012**, *14*, 639.
- (229) Weidmann, V.; Kliewer, S.; Sick, M.; Bycinskij, S.; Kleczka, M.; Rehbein, J.; Griesbeck, A. G.; Zorn, H.; Maison, W. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *121*, 15.
- (230) Li, G.; Kaplan, M. J.; Wojtas, L.; Antilla, J. C. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1960.
- (231) Martin, C. L.; Overman, L. E.; Rohde, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4894.
- (232) Wang, D.; Nugent, W. A. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 7307.
- (233) Dorsky, J.; Easter, J. W. M.; Tavares, R. F.; Google Patents: 1975.
- (234) Lenardão, E. J.; Botteselle, G. V.; de Azambuja, F.; Perin, G.; Jacob, R. G. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6671.
- (235) Hamatani, T.; Matsubara, S.; Matsuda, H.; Schlosser, M. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 2875.
- (236) Plagemann, I.; Zelena, K.; Arendt, P.; Ringel, P. D.; Krings, U.; Berger, R. G. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *87*, 99.
- (237) Andreou, A.; Feussner, I. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1504.
- (238) Erdmenger, T.; Guerrero-Sanchez, C.; Vitz, J.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3317.
- (239) Göthlich, A.; Koltzenburg, S.; Schornick, G. *Chem. Unserer Zeit* **2005**, *39*, 262.
- (240) McGrath, M. P.; Sall, E. D.; Tremont, S. J. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 381.

- (241) Montaudo, G.; Samperi, F.; Montaudo, M. S. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 277.
- (242) Danis, P. O.; Karr, D. E.; Xiong, Y.; Owens, K. G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 862.
- (243) Macha, S. F.; Limbach, P. A.; Hanton, S. D.; Owens, K. G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 732.
- (244) Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311.
- (245) Gupta, P.; Sethi, V. K.; Taneja, S. C.; Shah, B. A.; Andotra, S. S.; Koul, S.; Chimni, S. S.; Qazi, G. N. *Helv. Chim. Acta* **2007**, *90*, 196.
- (246) Wüst, M.; Reindl, J.; Fuchs, S.; Beck, T.; Mosandl, A. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3145.
- (247) Tateba, H.; Mihara, S. *Agr. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 2271.
- (248) Serra, S.; Fuganti, C. *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 2100.
- (249) Serra, S.; Fuganti, C.; Brenna, E. *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 193.
- (250) Guth, H. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1559.
- (251) Pisarnitskii, A. F. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2001**, *37*, 552.
- (252) Sakan, T.; Isoe, S.; Hyeon, S. B. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 1623.
- (253) Rocca, J. R.; Tumlinson, J. H.; Glancey, B. M.; Lofgren, C. S. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 1889.
- (254) Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512.
- (255) Högnadóttir, Á.; Rouseff, R. L. *J Chromatogr A* **2003**, *998*, 201.
- (256) Mallard, W. G.; Andriamaharavo, N. R.; Mirokhin, Y. A.; Halket, J. M.; Stein, S. E. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10231.
- (257) Angioni, A.; Barra, A.; Cereti, E.; Barile, D.; Coisson, J. D.; Arlorio, M.; Dessi, S.; Coroneo, V.; Cabras, P. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3530.
- (258) Merle, H.; Morón, M.; Blázquez, M. A.; Boira, H. *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 491.
- (259) Helmig, D.; Revermann, T.; Pollmann, J.; Kaltschmidt, O.; Hernandez, A. J.; Bocquet, F.; David, D. *J Chromatogr A* **2003**, *1002*, 193.
- (260) Jalali-Heravi, M.; Zekavat, B.; Sereshti, H. *J Chromatogr A* **2006**, *1114*, 154.
- (261) Peng, C.; Yang, Z.; Maltby, D. *J Chromatogr A* **1991**, *586*, 113.
- (262) Jordan, M. J.; Margaria, C. A.; Shaw, P. E.; Goodner, K. L. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5386.
- (263) Ádámová, M.; Oriňák, A.; Halás, L. *J Chromatogr A* **2005**, *1087*, 131.
- (264) Warthen, J.; Lee, C.-J.; Jang, E.; Lance, D.; McInnis, D. *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 1891.
- (265) Wongpornchai, S.; Sriseadka, T.; Choonvisase, S. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 457.
- (266) Asuming, W. A.; Beauchamp, P. S.; Descalzo, J. T.; Dev, B. C.; Dev, V.; Frost, S.; Ma, C. W. *Biochem. Syst. Ecol.* **2005**, *33*, 17.
- (267) Prasad, V. P.; Wagner, S.; Keul, P.; Hermann, S.; Levkau, B.; Schäfers, M.; Haufe, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5168.